

Institut für Neurowissenschaften und Medizin
Nuklearchemie (INM-5)

Untersuchung von Struktur- Eigenschaftsbeziehungen von Adenosin A₁-Rezeptorliganden zur Entwicklung ¹⁸F-markierter Radioliganden

Sabrina Kreft

**Untersuchung von Struktur-
Eigenschaftsbeziehungen von Adenosin
A₁-Rezeptorliganden zur Entwicklung
¹⁸F-markierter Radioliganden**

Sabrina Kreft

Berichte des Forschungszentrums Jülich; 4383
ISSN 0944-2952
Institut für Neurowissenschaften und Medizin
Nuklearchemie (INM-5)
Jül-4383

Vollständig frei verfügbar über das Publikationsportal des Forschungszentrums Jülich (JuSER)
unter www.fz-juelich.de/zb/openaccess

Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek, Verlag
52425 Jülich
Tel.: +49 2461 61-5220
Fax: +49 2461 61-6103
E-Mail: zb-publikation@fz-juelich.de
www.fz-juelich.de/zb

Kurzzusammenfassung

Zur Entwicklung neuer, zum hochaffinen und selektiven Adenosin A₁-Rezeptorantagonisten 8-Cyclopentyl-3-(3-[¹⁸F]fluorpropyl)-1-propylxanthin ([¹⁸F]CPFPX) analoger Radioliganden mit verbesserten metabolischen Eigenschaften für die molekulare Bildgebung mittels Positronen-Emissions-Tomographie wurden zunächst die Affinitäten unterschiedlicher im Haus dargestellter Xanthinderivate zum A₁-Adenosinrezeptor untersucht, um Zusammenhänge zwischen den Molekülstrukturen sowie den Bindungseigenschaften zu erkennen.

Auf dieser Grundlage und aus Ergebnissen vorheriger im Haus durchgeführter Metabolismusstudien, in der Literatur beschriebenen Eigenschaften sowie der computergestützten Bestimmung von Lipophilieparametern verschiedener Xanthinderivate wurden neue Verbindungen als möglichst metabolisch stabilere Liganden des A₁-Adenosinrezeptors konzipiert. Aus diesen gingen das 8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(3-fluorpropyl)xanthin (CBCPM) und das 1-Cyclopropylmethyl-3-(3-fluorpropyl)-8-(1-methylcyclobutyl)xanthin (CPMMCB) als vielversprechendste hervor.

Die nicht radioaktiven Zielverbindungen sowie ihre Mesylatvorläuferverbindungen für Radiofluorierungen konnten erfolgreich synthetisiert werden. Die Radiosynthesen erfolgten ausgehend von trägerarmem [¹⁸F]Fluorid durch nukleophile Substitution und anschließende Entschützung der Markierungsprodukte. Die Darstellung und Isolierung der radioaktiv markierten Produkte gelang mit einer radiochemischen Ausbeute (RCA) von $21,3 \pm 3,8 \%$ und einer molaren Aktivität von $12,3 \pm 0,2 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ ($0,33 \pm 0,01 \text{ Ci}/\mu\text{mol}$) im Fall des [¹⁸F]CBCPM, sowie mit $14,4 \pm 2,5 \%$ RCA und einer molaren Aktivität von $36,5 \pm 1,2 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ ($0,99 \pm 0,03 \text{ Ci}/\mu\text{mol}$) beim [¹⁸F]CPMMCB.

Beide Verbindungen weisen hohe Affinitäten zum Adenosin A₁-Rezeptor auf, welche durch *in vitro* Konkurrenzexperimente bestimmt wurden. Die entsprechenden Bindungsdissoziationskonstanten betragen $K_i = 10,1 \text{ nM}$ (CBCPM) und $K_i = 15,5 \text{ nM}$ (CPMMCB), wobei der K_i -Wert des etablierten CPFPX als Referenzverbindung in dieser Versuchsreihe $15,1 \text{ nM}$ betrug. Autoradiographische Untersuchungen der radiofluorierten Xanthinderivate bestätigten ebenfalls hohe Affinitäten sowie hohe Selektivitäten zum gewünschten Rezeptor. Die spezifischen Bindungen lagen bei $86,8 \%$ für [¹⁸F]CBCPM bzw. $84,8 \%$ für [¹⁸F]CPMMCB. Beide nicht radiofluorierten Verbindungen zeigten bei *in vitro* Studien einen deutlich langsameren Metabolismus durch humane Lebermikrosomen als das CPFPX.

So ist es gelungen, mit [¹⁸F]CBCPM und [¹⁸F]CPMMCB zwei neue, hochaffine und selektive Xanthinderivate als potentielle Radioliganden des Adenosin A₁-Rezeptors darzustellen. Der langsamere Abbau der Liganden bei *in vitro* Metabolismusstudien begründet die Annahme einer auch deutlich größeren *in vivo* Stabilität und damit verbunden einer angestrebten längeren biologischen Halbwertszeit.

Abstract

For the development of new analogues of the highly affine and selective radioligand 8-cyclopentyl-3-(3-[^{18}F]fluoropropyl)-1-propylxanthine ([^{18}F]CPFPX) for the adenosine A_1 receptor with improved metabolic stability for molecular imaging by positron-emission-tomography the affinities of different in-house synthesized xanthine derivatives to the adenosine A_1 receptor were investigated, in order to reveal relationships between molecular structure and binding properties of these ligands.

Based on these studies, on the results of earlier studies on metabolism in-house, known biological properties as well as computed lipophilicity parameters of various xanthine derivatives, new compounds were designed as possible adenosine A_1 receptor ligands. From a series of xanthine derivatives 8-cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(3-fluoropropyl)xanthine (CBCPM) and 1-cyclopropylmethyl-3-(3-fluoropropyl)-8-(1-methylcyclobutyl)xanthine (CPMMCB) emerged as the most suitable candidates.

The non-radioactive target compounds and corresponding mesylate precursors for radiofluorination could successfully be synthesized. The labelled products were obtained by nucleophilic substitution with no-carrier-added [^{18}F]fluoride and subsequent deprotection. [^{18}F]CBCPM was obtained and isolated in radiochemical yields of $21.3 \pm 3.8\%$ and a molar activity of $12.3 \pm 0.2\text{ GBq}/\mu\text{mol}$ ($0.33 \pm 0.01\text{ Ci}/\mu\text{mol}$). In the case of [^{18}F]CPMMCB, a radiochemical yield of $14.4 \pm 2.5\%$ and a molar activity of $36.5 \pm 1.1\text{ GBq}/\mu\text{mol}$ ($0.99 \pm 0.03\text{ Ci}/\mu\text{mol}$) could be achieved.

In vitro competition assays revealed a high affinity to the adenosine A_1 receptor for both compounds. The inhibition constants were $K_i = 10.1\text{ nM}$ (CBCMP) and $K_i = 15.5\text{ nM}$ (CPMMCB), while the K_i value of the established CPFPX as reference compound in this test series was 15.1 nM . Autoradiographic studies confirmed the high affinity as well as high selectivity of the radiofluorinated compounds to the target receptor. The specific binding amounted to 86.8% for [^{18}F]CBCPM and 84.8% for [^{18}F]CPMMCB. In *in vitro* studies using human liver microsomes both new non labeled xanthine derivatives show a distinctly slower metabolism than CPFPX.

Thus, it was successful to develop [^{18}F]CBMCP and [^{18}F]CPMMCB as two new, highly affine and selective xanthine derivatives, potential radioligands for the adenosine A_1 receptor. The slower degradation of the ligands in *in vitro* studies supports reasonable presumptions of a significantly higher *in vivo* stability causing the aspired longer biological half-life.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Radionuklide zur Anwendung in der Medizin.....	1
1.2	Mit Fluor-18 markierte Radiotracer.....	3
1.2.1	Produktion von Fluor-18.....	3
1.2.2	Markierungsreaktionen mit Fluor.....	5
1.3	Das Adenosin-Rezeptorsystem.....	11
1.3.1	Struktur und Funktion.....	11
1.3.2	Adenosin A ₁ -Rezeptorliganden für die Positronen-Emissions-Tomographie.....	14
1.4	Bindungsstudien mit Radioliganden.....	17
1.4.1	Sättigungsexperimente.....	18
1.4.2	Kinetische Experimente.....	20
1.4.3	Kompetitionsexperimente.....	22
1.5	Funktionelle Assays zur Untersuchung von GPCR-Liganden.....	24
2	Problemstellung.....	27
3	Ergebnisse und Diskussion.....	29
3.1	Bindungsstudien an humanen Adenosin A ₁ -Rezeptoren.....	29
3.1.1	Optimierung der Parameter für die Kompetitionassays.....	30
3.1.2	Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten des [³ H]DPCPX.....	33
3.1.3	Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten verschiedener Xanthinderivate.....	35
3.2	Funktionelle Assays.....	37
3.3	Auswahl von Xanthinderivaten als neue, potentiell affine Adenosin A ₁ -Rezeptorliganden.....	44
3.3.1	Publizierte Struktur-Affinitäts-Beziehungen.....	44
3.3.2	Vorhergegangene Metabolismusstudien.....	46
3.3.3	Konzipierte Xanthinderivate als mögliche Adenosin A ₁ -Rezeptorliganden.....	47
3.4	Darstellung eines orthogonal geschützten Xanthinderivats und Synthese der Xanthinderivate.....	51

3.5	Radiosynthesen von [^{18}F]CBCPM und von [^{18}F]CPMMCB	74
3.5.1	Optimierung der Markierungsreaktion	75
3.5.2	Entschätzung zum [^{18}F]CBCPM bzw. [^{18}F]CPMMCB und molare Aktivität	79
3.6	Präklinische Evaluierung des CBCPM und des CPMMCB	82
3.6.1	Untersuchung der Bindungseigenschaften in Kompetitionsassays	82
3.6.2	Autoradiographische Untersuchungen	83
3.6.3	Metabolismusstudien	85
4	Experimenteller Teil	89
4.1	Verwendete Chemikalien und Methoden	89
4.2	Bindungsstudien an humanen Adenosin A ₁ -Rezeptoren	91
4.2.1	Vorbereitung der Zellmembranen	91
4.2.2	Optimierung der Parameter der Kompetitionsassays	94
4.2.3	Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten des [^3H]DPCPX	96
4.2.4	Durchführung der Kompetitionsassays	97
4.3	Validierung und Durchführung eines cAMP-Glo™ Assays	97
4.4	Synthesen zur Darstellung der Xanthinderivate	99
4.5	Radiosynthesen der [^{18}F]Fluorxanthinderivate	132
4.6	Metabolismusstudien der Xanthinderivate	135
4.7	Autoradiographische Untersuchungen der [^{18}F]Fluorxanthine	136
5	Zusammenfassung	139
6	Literatur	145
7	Anhang	155

1 Einleitung

1.1 Radionuklide zur Anwendung in der Medizin

Radionuklide und damit hergestellte Radiotracer finden in vielen Bereichen der Medizin Anwendung. Sie werden sowohl für die Entwicklung neuer Medikamente, als auch für diagnostische Untersuchungen und zur Strahlentherapie eingesetzt [1, 2]. Die Produktion von Radionukliden kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Neutronenreiche Radionuklide werden am Kernreaktor erzeugt, sie unterliegen überwiegend einem β^- -Zerfall. Die Herstellung neutronenarmer Radionuklide erfordert meist Beschleuniger, in der Regel Zyklotrone. Diese Nuklide zerfallen durch Positronenemission oder Elektroneneinfang [2].

Die Radionuklide werden je nach Zerfalleigenschaften für verschiedene Anwendungen verwendet. So werden längerlebige β^- -Strahler wie Tritium ($T_{1/2} = 12,3$ a), Kohlenstoff-14 ($T_{1/2} = 5730$ a) und Iod-125 ($T_{1/2} = 60$ d) für analytische und diagnostische *in vitro* Studien eingesetzt [2]. Die zytotoxischen Eigenschaften ionisierender Strahlung finden in der Radiotherapie Anwendung. Ein Beispiel stellt hier die Endoradiotherapie (ERT) dar. Bei dieser lagern sich Radiopharmaka gezielt in Tumorgeweben an, um sie so zu zerstören. Hier finden Nuklide Anwendung, welche einen hohen linearen Energietransfer (LET) besitzen. So werden α -Teilchen- oder Augerelektronen-Emitter zur Therapie bei kleinen Tumoren verwendet, bei größeren Tumoren wird auf β^- -Strahlen zurückgegriffen, welche eine höhere Reichweite im Gewebe besitzen. Die optimalen Halbwertszeiten der hierzu verwendeten Nuklide betragen ca. sechs Stunden bis sieben Tage [3, 4]. Bei *in vivo* Untersuchungen finden hingegen kurzlebige Radionuklide Anwendung, deren Zerfall außerhalb des Körpers durch bildgebende Verfahren wie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) oder die Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT) beobachtet werden kann [2].

Für SPECT-Untersuchungen werden Radionuklide verwendet, welche durch Elektroneneinfang oder Isomerenübergang zerfallen. Nach Möglichkeit soll hierbei nur ein Photon pro Zerfall ausgesendet werden, welches außerhalb des Körpers registriert werden kann. Andere Zerfallsarten sollten möglichst nicht vorkommen, um die Strahlenbelastung für die Patienten zu minimieren. Die Energie der Strahlung sollte im Bereich von 70 – 250 keV liegen. So kann sie zur externen Detektion den Körper durchdringen und ist gut über preiswerte NaI-Kristalle detektierbar [2]. Das am häufigsten verwendete Radionuklid für derartige Untersuchungen ist Technetium-99m ($T_{1/2} = 6$ h), welches durch Isomerenübergang zerfällt. Ein großer Vorteil ist seine prinzipiell stete Verfügbarkeit über das $^{99}\text{Mo} \rightarrow ^{99\text{m}}\text{Tc}$ Generatorsystem [2].

Bei der Positronen-Emissions-Tomographie macht man sich die bei dem Positronenzerfall entstehende Annihilationsstrahlung zu Nutze. Sobald sich das beim Zerfall ausgesendete Positron thermalisiert und mit einem Elektron zum „Positronium-Atom“ verbunden hat, zerfällt dieses unter Emission zweier γ -Quanten von je 511 keV. Diese werden in einem Winkel von 180° ausgesendet und außerhalb des Körpers über Koinzidenzmessungen an Kristalldetektoren detektiert. Da die Zählhausbeute aufgrund der Koinzidenzmessung tiefenunabhängig ist, können Streu- und Absorptionsverluste im Körper durch eine zusätzliche Transmissionsmessung vor der eigentlichen PET-Untersuchung exakt bestimmt und auf mathematischem Weg korrigiert werden. So ist eine Quantifizierung der Aktivität und damit der lokalen Tracermengen möglich [5].

Zu den wichtigsten in der Positronen-Emissions-Tomographie angewendeten Radionukliden zählen die kurzlebigen Positronenemitter Kohlenstoff-11 ($T_{1/2} = 20,4$ min) und Fluor-18 ($T_{1/2} = 109,7$ min), viel weniger häufig Sauerstoff-15 ($T_{1/2} = 2,07$ min) und Stickstoff-13 ($T_{1/2} = 10,0$ min), welche über Niedrigenergie-Zyklotrone produziert werden können [1, 2]. Dabei sind meist nur mit ^{11}C , ^{15}O und ^{13}N authentische Markierungen von Biomolekülen möglich. Hierbei wird ein im Molekül vorkommendes stabiles Atom durch ein Radioisotop des entsprechenden Elements ersetzt. Diese Methode bietet den Vorteil, dass die chemischen Eigenschaften sowie der Metabolismus bei *in vivo* Studien der markierten Verbindungen erhalten bleiben [1, 6]. Mit Fluor-18 hingegen sind authentische Markierungen nur bei fluorhaltigen pharmakologischen Verbindungen möglich, da Fluor in Biomolekülen nicht zu finden ist [1]. So überwiegen mit diesem Radionuklid die analogen Markierungen, bei denen ein Atom im Molekül durch ein radioaktives Isotop eines anderen Elements substituiert wird [1, 7]. Im Fall des Fluor-18 wird hierbei in der Regel ein Wasserstoff-Atom des ursprünglichen Moleküls ersetzt, wobei es als Folge der ähnlichen Van-der-Waals-Radien kaum zu räumlich-geometrischen Änderungen, jedoch durch die stark unterschiedliche Elektronegativität zu erheblichen Unterschieden in der Polarisierung der Verbindung kommt [6, 8].

Bei der Synthese radioaktiv markierter Verbindungen für die oben genannten Anwendungen ist der Trägergehalt entscheidend. Dabei wird zwischen trägerfreien (carrier-free, c.f.), trägerarmen (no-carrier-added, n.c.a.) und geträgerten (carrier-added, c.a.) Verbindungen unterschieden. Zur Anwendung für *in vivo* Studien wird die trägerarme Variante bevorzugt. So werden dem Körper nicht unnötig viele Fremdstoffe zugeführt, sowie toxische Wirkungen minimiert. Insbesondere werden bei den geringen verabreichten Mengen im nanomolaren Bereich so gut wie keine Störungen der biochemischen Gleichgewichte hervorgerufen. Daher stellt bei der Synthese von n.c.a. Radiotracern ihre spezifische Aktivität (A_s) eine entscheidende Größe dar. Hier wird die Aktivität (A) in Abhängigkeit von der Masse der

radioaktiv markierten Verbindung zuzüglich dem vorhandenen Träger bestimmt, somit ist sie ein Maß für den Trägergehalt der Verbindung. Sie wird in der Regel abhängig von der Stoffmenge (n) als molare Aktivität in GBq/ μmol angegeben (vgl. Gleichung 1).

$$A_s = \frac{A}{n} \left[\frac{\text{GBq}}{\mu\text{mol}} \right] \quad [1]$$

1.2 Mit Fluor-18 markierte Radiotracer

Obwohl die Möglichkeiten zu authentischen Markierungen mit Fluor-18 oftmals fehlen, besitzt dieses Nuklid für die Anwendung in der Positronen-Emissions-Tomographie sehr große Bedeutung [8]. Ein Grund hierfür sind seine besonders geeigneten Zerfallseigenschaften. So kann durch die im Vergleich mit anderen Positronenemittern niedrige β^+ -Energie von 0,635 MeV eine gute Auflösung bei PET-Studien erzielt werden. Zusätzlich wird die Strahlenexposition der Patienten durch die geringe Zerfallsenergie relativ niedrig gehalten [1, 8]. Weiterhin sind aufgrund der bereits erwähnten Halbwertszeit von 109,7 Minuten ausgedehntere Untersuchungen langsam ablaufender pharmakologischer Prozesse mit Fluor-18-markierten Verbindungen *in vivo* möglich, und zeitlich anspruchsvollere Radiosynthesen ^{18}F -markierter Verbindungen, wie zum Beispiel solche über mehrere Stufen, können durchgeführt werden [1, 8]. Einen weiteren Vorteil der verhältnismäßig langen Halbwertszeit stellt die Möglichkeit des Transports radiofluorierter Pharmaka zu Anwendungsorten dar, an denen kein Zyklotron vorhanden ist [9]. Aus diesen Gründen wurde auch in der vorliegenden Arbeit auf Fluor-18 als Radionuklid zur Markierung der angestrebten Zielverbindungen zurückgegriffen.

1.2.1 Produktion von Fluor-18

Neben der gängigen Produktion von Fluor-18 mit Hilfe eines Zyklotrons kann die Herstellung von Fluor-18 prinzipiell auch an Reaktoren über die „*in situ*“ aufeinanderfolgenden $^6\text{Li}(n,\alpha)t$ und $^{16}\text{O}(t,n)^{18}\text{F}$ Kernreaktionen erfolgen [10]. Durch die Wahl des Targets und der entsprechenden Kernreaktion wird Fluor-18 in verschiedenen chemischen Formen mit unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten erhalten [11]. Ein entscheidender Unterschied ist hierbei, ob nukleophiles n.c.a. $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ oder elektrophiles $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ -Gas, welches produktionsbedingt nur in geträgerter Form darstellbar ist, erhalten werden soll.

Die Produktion von n.c.a. $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ geschieht heutzutage überwiegend durch die $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ Kernreaktion in einem mit Sauerstoff-18 angereichertem Wassertarget. Die

Bestrahlung erfolgt generell durch einen 16 MeV Protonenstrahl. Hierbei kann neben hohen Ausbeuten von mehr als 2 GBq/μAh eine hohe molare Aktivität von bis zu 600 GBq/μmol erreicht werden [6]. Eine weitere, weniger günstige Möglichkeit der Darstellung von trägerarmen [^{18}F]Fluorid ist durch die Bestrahlung von natürlichem Wasser mit Helium-3 über die Kernreaktion $^{16}\text{O}(^3\text{He},\text{p})^{18}\text{F}$ gegeben. Die erreichbare molare Aktivität ist mit 50 GBq/μmol ebenfalls sehr hoch, jedoch liegt die Produktionsrate dieser Kernreaktion nur bei 0,26 GBq/μAh [6]. Auch die Produktion von n.c.a. [^{18}F]Fluorid aus Neon-20 über die $^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$ Kernreaktion ist möglich. Hierbei wird das Target nach erfolgter Bestrahlung evakuiert und mit Wasser gespült, um das [^{18}F]Fluorid in Form einer wässrigen Lösung zu erhalten. Dabei wurden molare Aktivitäten von über 370 GBq/μmol bei Ausbeuten von bis zu 0,30 GBq/μAh erreicht [12].

Die Produktion von elementarem [^{18}F]F₂-Gas kann in einem mit natürlichem Neon gefüllten Gastarget aus Nickel über eine $^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$ Kernreaktion oder in einem mit Sauerstoff-18 angereicherten Sauerstoffgastarget durch die Kernreaktion $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ erfolgen [6]. Ein großes Problem bei diesen Verfahren ist, dass das entstehende Fluor-18 von den Targetwänden absorbiert wird. Aus diesem Grund muss dem jeweiligen Targetgas inaktives, elementares Fluor zugesetzt werden, um das an den Wänden absorbierte [^{18}F]Fluor durch Isotopenaustausch mit elementarem Fluor wieder zu gewinnen. Hierdurch ist eine trägerarme Produktion nicht möglich. Bei der Verwendung der $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ Kernreaktion ist zudem eine zweite Bestrahlung nach Entfernung des teuren [^{18}O]O₂-Targetgases nötig, was einen hohen Aufwand darstellt [6, 11, 13]. Die erreichbare molare Aktivität bei der Herstellung von [^{18}F]F₂-Gas ist dadurch mit 0,1 GBq/μmol bei der $^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$ -Kernreaktion bzw. 0,6 GBq/μmol bei der $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ -Kernreaktion verhältnismäßig gering [6, 13].

Eine weitere indirekte Möglichkeit zu dessen Herstellung mit höherer spezifischer Aktivität ist eine elektrische Entladung von [^{18}F]Methylfluorid, welches zuvor über eine nukleophile Substitution mit n.c.a. [^{18}F]Fluorid an Methyljodid dargestellt wird, in einem Xenon/Neon-Gasgemisch in Gegenwart von Spuren Fluorgas [6]. Nach dieser Methode können molare Aktivitäten von bis zu 30 GBq/μmol erreicht werden, welche jedoch immer noch zumindest eine Größenordnung geringer sind als die für viele Anwendungen nötigen und mit n.c.a. [^{18}F]Fluorid erreichbaren [14].

1.2.2 Markierungsreaktionen mit Fluor

Zur Fluorierung organischer Moleküle sind viele Reaktionen bekannt. Diese können jedoch nicht ausnahmslos für Radiofluorierungen verwendet werden. Hierfür sind hauptsächlich zwei Gründe verantwortlich. Viele im equimolaren Maßstab gut laufende Reaktionen führen bei Reaktionen mit trägerarmen Mengen zu niedrigen Ausbeuten. Als Beispiel ist die Balz-Schiemann-Reaktion zu nennen. Durch die thermische Zersetzung von Diazoniumtetrafluorboraten können hier in makroskopischem Maßstab die entsprechenden Arylfluorverbindungen unter Stickstoffabspaltung gebildet werden, die erzielten Ausbeuten betragen fast 100 % [15]. Im Fall von Fluor-18 muss dieses in Form von [^{18}F]Tetrafluorborat vor der Synthese des Diazoniumsalzes oder durch Austausch am Diazoniumtetrafluorborat eingeführt werden, wodurch nur eine geringe molare Aktivität erzielt werden kann [16]. Da jeweils nur ein Fluoratom pro Molekül reagiert, liegt die theoretisch maximal erreichbare radiochemische Ausbeute bei dieser Reaktion bei 25 %, zudem entstehen viele Nebenprodukte [15].

Eine wichtige Rolle bei Markierungsreaktionen mit Fluor-18 spielt der Zeitfaktor. Eine Synthese inklusive Aufreinigung einer radioaktiv markierten Verbindung sollte in der Regel nicht länger als drei Halbwertszeiten des entsprechenden Radionuklids dauern, da andernfalls zu viel Aktivität durch Zerfall verloren geht und so auch die spezifische Aktivität der dargestellten Verbindung sinkt [17]. Daher ist es sinnvoll, das Radionuklid so spät wie möglich im jeweiligen Syntheseverlauf einzubauen und somit möglichst wenige radiochemische Synthesestufen durchführen zu müssen.

Die bisher entwickelten Radiofluorierungen lassen sich in direkte und indirekte Methoden aufteilen. Zu den direkten Radiofluorierungsreaktionen zählen die elektrophile Addition und die elektrophile sowie die nukleophile Substitution. Indirekten Methoden stellen Aufbausynthesen über ^{18}F -markierte intermediäre Verbindungen oder prosthetische Gruppen dar [6].

Elektrophile Markierungen mit [^{18}F]Fluor

Typische elektrophile Markierungsreaktionen stellen die elektrophile Addition sowie die elektrophile Substitution an elektronenreichen Verbindungen wie Alkenen, aromatischen Ringen, Carbanionen sowie metallorganischen Verbindungen mit [^{18}F]F₂ dar.

Bei elektrophilen Radiofluorierungen aromatischer Systeme handelt es sich in der Regel um Fluordeprotonierungs- und Fluordemetallierungsreaktionen [8]. Durch Addition des elektrophilen [^{18}F]F₂ an den aromatischen Ring wird ein Areniumion als Intermediat gebildet. Dieses

geht unter Abspaltung der Abgangsgruppe in die entsprechende [^{18}F]Fluorarylverbindung über [8]. Als Abgangsgruppen für diese Reaktionen dienen neben Protonen substituierte Metalle wie Quecksilber-, Zinn-, Silizium- oder Germaniumgruppen. Die Funktionalisierung mit Metallresten bewirkt hierbei eine wesentlich verbesserte Regioselektivität [6, 8].

Wie bereits in Kapitel 1.2.1 verdeutlicht wurde, muss bei der Herstellung von [^{18}F]F₂ nicht-radioaktives F₂-Trärgas zugegeben werden. Aufgrund der dadurch geringen erzielbaren spezifischen Aktivitäten und radiochemischen Ausbeuten sind elektrophile Fluorierungsreaktionen zur Einführung von Fluor-18 in eine Verbindung nur sinnvoll, wenn keine hohe spezifische Aktivität des Zielmoleküls gefordert ist. Dies ist beispielsweise beim wichtigsten Radiopharmakon für die Positronen-Emissions-Tomographie, der 2-[^{18}F]Fluor-2-deoxy-D-glucose ([^{18}F]FDG), der Fall. Geringere Trägermengen sind hierbei unkritisch, da FDG nicht toxisch ist und Glucose ohnehin von Natur aus in größeren Mengen im Körper vorkommt. Nach der historisch zunächst entwickelten Radiosynthese wird [^{18}F]F₂ elektrophil an 3,4,6-Tri-O-acetyl-D-glucal (TAG) addiert. Nach Trennung der gebildeten Epimere erfolgt eine Hydrolyse zum gewünschten Produkt [18]. Aufgrund der Vielzahl an Nebenprodukten sowie der geringen erreichbaren spezifischen Aktivitäten werden elektrophile Radiofluorierungsreaktionen immer nur dann verwendet, wenn keine alternative trägerarme Radiosynthese ausgehend von n.c.a. [^{18}F]Fluorid verfügbar ist und toxikologische Probleme nicht gegeben sind. Das [^{18}F]FDG wird heutzutage auch aus ökonomischen Gründen ausnahmslos über eine nukleophile Markierungsreaktion mit n.c.a. [^{18}F]Fluorid hergestellt [19].

Ein weiterer Nachteil elektrophiler Radiofluorierungsreaktionen ist die große Anzahl möglicher Nebenreaktionen aufgrund der hohen Reaktivität des [^{18}F]Fluors [6, 8]. Etwas verbesserte Selektivitäten können durch mildere sekundäre Fluorierungsreagentien wie Acetylhypofluorid [20] und Xenondifluorid [21] für elektrophile Additionen und elektrophile Substitutionen erreicht werden, dennoch kommt es weiterhin zu den oben erwähnten Problemen [6].

Nukleophile Markierungen mit [^{18}F]Fluorid

Die nukleophilen Reaktionen mit n.c.a. [^{18}F]Fluorid stellen daher zurzeit für viele ^{18}F -markierte Verbindungen fast die einzigen Fluorierungsmethoden mit der Möglichkeit zur trägerarmen Markierung unter Erhaltung einer hoher spezifischen Aktivität dar [6, 8].

Bedingt durch die Herstellung des [^{18}F]Fluorids (vgl. Kapitel 1.2.1) liegt es als Fluoridanion in wässriger Lösung vor. Durch die starke Solvatisierung besitzt es keinerlei nukleophile Potenz, so dass vor den Markierungsreaktionen zuerst die Hydrathülle entfernt und das

Fluoridanion aktiviert werden muss. Hierzu wird der wässrigen [^{18}F]Fluorid-Lösung eine schwache, nur wenig nukleophile Base in Form von wässriger Carbonat-, Hydrogencarbonat- oder Oxalatlösung zugesetzt [6, 22, 23]. Das Wasser wird generell durch mehrmalige, konsekutive azeotrope Destillation mit Acetonitril im Argonstrom entfernt. Durch die Trocknung kann jedoch nie die gesamte Hydrathülle entfernt werden, kleine Mengen Wasser bleiben stets am [^{18}F]Fluorid haften [23]. Daher muss je nach Empfindlichkeit der nachfolgenden Markierungsreaktion gegebenenfalls wiederholt azeotrop getrocknet werden. Als Lösungsmittel für die anschließenden Markierungsreaktionen dienen dipolar-aprotische Lösungsmittel wie Acetonitril bei Verwendung aliphatischer Vorläuferverbindungen oder höher siedendes Dimethylsulfoxid und Dimethylformamid zur Markierung aromatischer Systeme [8, 23]. Zur weiteren Aktivierung wird ein Phasentransferkatalysator wie Tetraalkylammoniumcarbonat oder der Aminopolyether Kryptofix[®] 2.2.2 zugegeben. Der Kryptand dient dabei der Isolierung des [^{18}F]Fluorids vom entsprechenden Gegenion der eingesetzten Base, meist Kalium, und erhöht so dessen Nukleophilie. Man spricht dann von einem „nackten“ [^{18}F]Fluorid-Ion [22].

Nukleophile aliphatische Substitutionen an Kohlenstoffatomen verlaufen unter den oben angegebenen Reaktionsbedingungen nach dem $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus unter Walden-Umkehr. Als Abgangsgruppen dienen für gewöhnlich Halogenide oder Schwefelsäureestergruppen wie Tosylate, Triflate oder Mesylate [6, 19, 24].

Die nukleophile aromatische Substitution besitzt weitaus größere Bedeutung bei der Darstellung ^{18}F -markierter Radiopharmaka. Ein Grund hierfür ist die meist höhere *in vivo* Stabilität aromatischer Verbindungen im Vergleich zu aliphatischen, da letztere leichter durch Enzyme gespalten werden können [23]. Bei der Fluorierung eines aromatischen Rings ist es notwendig, dass dieser nicht nur eine gute Abgangsgruppe, sondern zusätzlich auch eine elektronenziehende Gruppe (EWG) in *ortho*- oder *para*-Position besitzt, welche den sp^3 Kohlenstoff aktiviert und den nukleophilen Angriff des [^{18}F]Fluorids erleichtert [6, 8]. Als Abgangsgruppe können neben den bei der Substitution an Aliphaten verwendeten Halogenen vor allem die Nitrogruppe oder die Trimethylammoniumgruppe dienen. Letzgenannte hat den Vorteil, dass die entsprechenden Salze nicht nur wie die Nitroverbindungen sehr stabil sind, sondern dass die Trimethylammoniumgruppe auf Grund ihrer positiven Ladung reaktiver ist, wodurch höhere radiochemische Ausbeuten erhalten werden können [6]. Als elektronenziehende und somit aktivierende Gruppe am aromatischen Ring können sowohl Nitro-, Cyano- und Trifluormethylgruppen, als auch Carbonylgruppen (Aldehyd-, Keton-, Ester- und Carbonsäuregruppen) dienen [6].

Eine neuere Verbindungskategorie zur ^{18}F -Markierung nukleophiler aromatischer Verbindungen stellen die Diaryliodoniumverbindungen dar (vgl. Abbildung 1). Bei diesen Vorläufern kann in bisher wenigen ausgewählten Fällen auf eine zusätzliche elektronenziehende Gruppe am Ring verzichtet werden, da das hypervalente Iod selbst neben der Funktion als Abgangsgruppe auch die Elektronendichte im Aromaten verringert und diesen so aktiviert. Somit sind auch elektronenreiche Verbindungen wie Methoxy-substituierte Arylverbindungen oder Heterozyklen ohne elektronenziehende Gruppen für nukleophile Fluorierungsreaktionen zugänglich [23, 25].

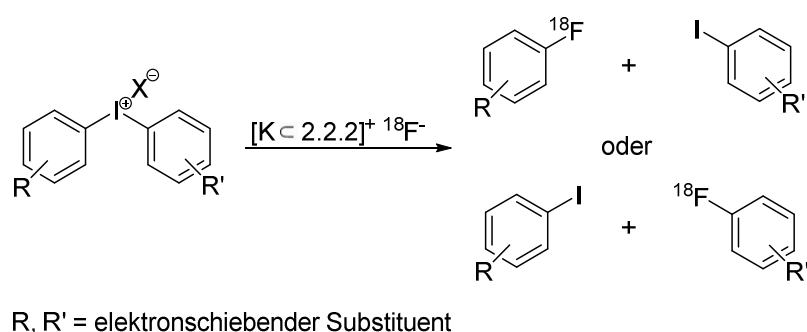


Abbildung 1: ^{18}F -Fluorierung elektronenreicher aromatischer Systeme über Iodoniumverbindungen (aus [23, 25]).

Aufbausynthesen ^{18}F -markierter Verbindungen

Komplexere ^{18}F -markierte Verbindungen lassen sich jedoch nur selten über direkte Fluorierungen herstellen. Hierzu gehören besonders elektronenreiche Verbindungen und Makromoleküle. Daher werden zu ihrer Darstellung reaktive ^{18}F -markierte Vorläufer synthetisiert, die anschließend zu dem gewünschten Produktmolekül aufgebaut werden. Dies geschieht mittels Aufbausynthesen oder über prosthetische Gruppen [6].

Zur Darstellung ^{18}F -markierter elektronenreicher aromatischer Verbindungen über Aufbausynthesen gibt es zwei Möglichkeiten. In beiden Fällen wird in ein aromatisches System eine elektronenziehende Gruppe eingeführt. Diese kann im Anschluss an die Fluorierungsreaktion entweder ganz aus der Verbindung entfernt oder in eine andere gewünschte funktionelle Gruppe zur Darstellung elektronenreicher Arylverbindungen umgewandelt werden [6]. Beispiele solcher ^{18}F -markierten Vorläufer für diverse Aufbausynthesen stellen 4- ^{18}F Fluor-1-nitrobenzole, 4-Cyano-1- ^{18}F fluorbenzole sowie substituierte 2- oder 4- ^{18}F Fluorbenzaldehyde dar [6]. Durch letztere können zum Beispiel durch Reduktion der Aldehydgruppe nach der Radiofluorierung die entsprechenden Benzylhydroxide oder -halogenide erhalten werden (vgl. Abbildung 2) [26]. Ebenso ist eine vollständige Entfernung der funktionellen Gruppe

durch reduktive Decarboxylierung zum substituierten [^{18}F]Fluorbenzol möglich. Eine weitere Aufbausynthese stellt die Baeyer-Villiger-Oxidation der genannten ^{18}F -fluorierten Benzaldehyde mit anschließender Hydrolyse dar, sie führt zu den entsprechenden [^{18}F]Fluorphenolen [6, 23, 26]. Besonders das in vielen Radiopharmaka vorkommende *para*-[^{18}F]Fluorphenol dient als nützlicher Vorläufer zur Synthese größerer Verbindungen [6, 23].

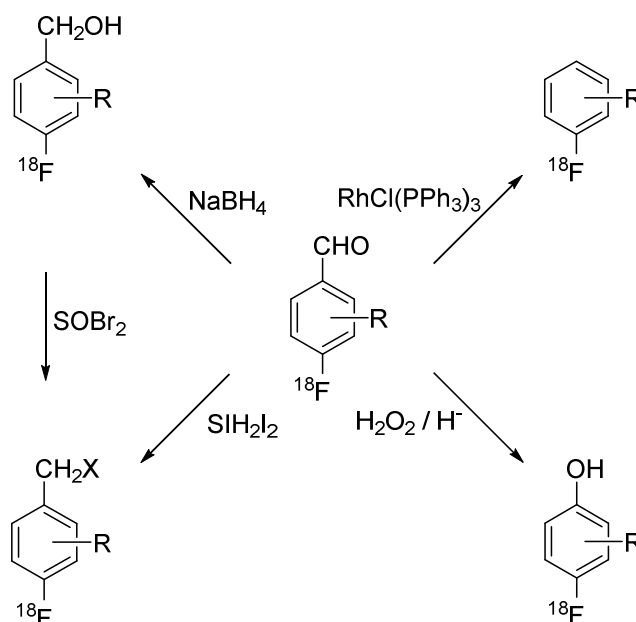
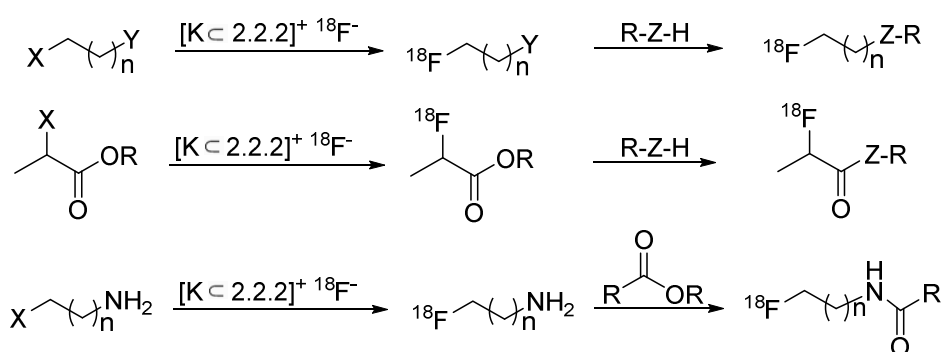


Abbildung 2: Mögliche Aufbausynthesen ausgehend von 4-[^{18}F]Fluorbenzaldehyd (aus [26]).

Fluor-18-markierte prosthetische Gruppen

Eine weitere Synthesemöglichkeit ^{18}F -fluorierter Verbindungen ist die Kupplung einer bereits markierten Verbindung, der prosthetischen Gruppe, mit einer zweiten Teilstruktur des gewünschten Zielmoleküls.



X, Y = Br, I, OTs, OTf; Z = N, O, S; R = Alkyl, Aryl

Abbildung 3: ^{18}F -Fluoralkylierung [27], ^{18}F -Fluoracylierung [28] und ^{18}F -Fluoramidierung [29] mit Hilfe prosthetischer Gruppen.

Zu diesen prosthetischen Gruppen gehören zum Beispiel [^{18}F]Fluoralkyl- [27], [^{18}F]Fluoracyl- [28] und [^{18}F]Fluoraminoderivate [29]. [^{18}F]Fluoralkylverbindungen dienen hierbei als Alkylierungsreagenz für ^{18}F -Fluorierungen im wasserfreien Medium (vgl. Abbildung 3, oben), während [^{18}F]Fluoracyl- und [^{18}F]Fluoraminoderivate hingegen Einsatz bei der Synthese vieler Peptide und Proteine im wässrigen Medium unter milden Bedingungen finden (vgl. Abbildung 3, Mitte, unten) [23].

Click-Chemie

Ein sehr geeignetes Konzept, ^{18}F -markierte Verbindungen über prosthetische Gruppen herzustellen, welches kürzlich in die Radiochemie übertragen wurde, besteht in der Click-Chemie. Diese umfasst eine Auswahl von Reaktionen, welche nahezu quantitativ unter milden Bedingungen wie z.B. im wässrigem Medium und bei geringen Temperaturen zum gewünschten Produkt führen [30]. Weitere Kriterien sind die breite Anwendbarkeit und die Stereospezifität der Reaktionen. Zudem entstehen bei diesem Reaktionstyp keine störenden Nebenprodukte, so dass das gewünschte Produkt leicht aufgearbeitet und isoliert werden kann [30]. Ein typisches Merkmal von Click-Reaktionen ist die Knüpfung von Kohlenstoff-Heteroatom-Bindungen. Dies geschieht beispielsweise durch Cycloadditionen ungesättigter Verbindungen sowie durch Ringöffnungsreaktionen von Epoxiden oder Aziridinen [30].

Eine wichtige Click-Reaktion zur Radiofluorierung von Verbindungen stellt die kupferkatalysierte [1,3]-dipolare Cycloaddition von Alkinen mit Aziden dar, bei denen einer der beiden Reaktionspartner ^{18}F -markiert ist. Hierüber können komplexere Moleküle synthetisiert und anschließend mit kurzer Reaktionszeit unter milden Bedingungen ^{18}F -fluoriert werden [31, 32]. So sind unter anderem ^{18}F -markierte Peptide über die [1,3]-dipolare Cycloaddition von [^{18}F]Fluoralkinen und azidfunktionalisierten Peptiden leicht zugänglich (vgl. Abbildung 4) [31].

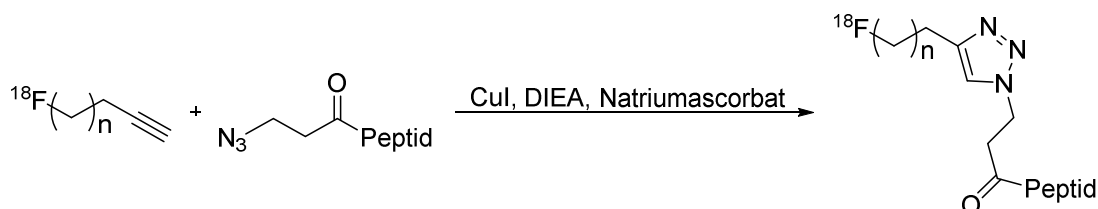


Abbildung 4: Kupferkatalysierte [1,3]-dipolare Cycloaddition zur Darstellung radifluorierter Peptide [31].

1.3 Das Adenosin-Rezeptorsystem

1.3.1 Struktur und Funktion

Das Nukleosid Adenosin besteht aus der Nukleinbase Adenin sowie dem Zucker β -D-Ribose (vgl. Abbildung 5). Es besitzt als Bestandteil einer Vielzahl von bioaktiven Molekülen, wie dem Adenosintriphosphat (ATP), welches eine wesentliche Rolle als Energielieferant besitzt und hierüber viele Zellfunktionen wie z.B. den Sauerstoffverbrauch steuert, der Ribonukleinsäure (RNA), welche wichtig für die Proteinsynthese ist, sowie dem cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) als sekundärem Botenstoff eine zentrale Rolle in der Biochemie aller Lebewesen [33]. Beim Adenosin handelt es sich um einen wichtigen Neuromodulator, welcher weit im Körper verbreitet und an vielen körpereigenen Prozessen beteiligt ist [34].

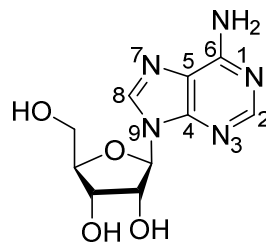


Abbildung 5: Molekülstruktur des Adenosins.

Die Adenosin-Rezeptoren gehören zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Diese aus sieben transmembranen Domänen bestehenden Rezeptoren befinden sich in den Zellmembranen und sind für die Signaltransduktion ins Innere der Zellen zuständig. Der N-Terminus befindet sich hierbei auf der extrazellulären Seite der Membran, während sich der C-Terminus innerhalb der Zelle befindet [35, 36].

Bisher sind vier Subtypen von Adenosinrezeptoren bekannt. Hierzu gehören die beiden „*high affinity*“ Adenosinrezeptoren A_1 und A_{2A} , welche durch Adenosin in nanomolaren Konzentrationen stimuliert werden, sowie die beiden „*low affinity*“ Subtypen A_{2B} und A_3 , welche zur Stimulation mikromolare Konzentrationen an Liganden benötigen [33]. Einen Überblick über die einzelnen Adenosinrezeptoren bietet Tabelle 1.

Alle Subtypen des Adenosinrezeptors sind an die Adenylylcyclase (AC) gekoppelt, welche das in den Zellen vorhandene ATP zu cAMP umsetzt. Dieses aktiviert wiederum die Proteinkinase A, welche die Übertragung von Phosphatresten auf Funktionsproteine bewirkt [37]. Bindet ein Rezeptorligand an den GPCR, so teilt sich dieser in eine G_α - und eine $G_{\beta,\gamma}$ -Untereinheit auf. Während die α -Einheit des G_i -Proteins beim Adenosin A_1 - und A_3 -Rezeptor die AC inhibiert, wird sie im Fall des G_s -Proteins bei den A_{2A} - und A_{2B} -Subtypen aktiviert [38].

Die $G_{\beta,\gamma}$ -Untereinheit aktiviert unterdessen im Fall der A_1 -, A_{2B} - und A_3 -Rezeptoren die Phospholipase C (PLC). Dieses Enzym hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) und ist somit für die Weiterleitung von Signalen vom Zelläußeren ins Zellinnere verantwortlich [38]. Des Weiteren werden durch die aktivierte $G_{\beta,\gamma}$ -Untereinheit K^+ -Kanäle geöffnet [35, 38].

Tabelle 1: Charakterisierung der Adenosinrezeptor-Subtypen [39, 40].

	A₁	A_{2A}	A_{2B}	A₃
G-Protein-Kopplung	G_i	G_s	G_s	$G_i, G_{q/11}$
Effektorsysteme	AC ↓ PLC ↑ K^+ -Kanäle ↑ Ca^{2+} -Kanäle ↓	AC ↑	AC ↑ PLC ↑	AC ↓ PLC ↑
Gewebe mit hoher Rezeptordichte	Gehirn (Cortex, Hippocampus, Cerebellum, Thalamus), Herz, Niere, Lunge, Fettzellen	Gehirn (Striatum, Nucleus Accumbens), Thrombozyten, Leber, Herz, Niere, Milz, Fettgewebe, Thymus, vasc. Endothelzellen	Gehirn, Lunge, Dickdarm, Blinddarm, Harnblase	speziesabhängig; Ratte: Testes >> Lunge, Niere > Gehirn Mensch: Lunge, Leber >> Gehirn, Aorta, Niere > Testes > Herz

G_i : Adenylylcyclase-stimulierendes G-Protein; G_s : Adenylylcyclase-inhibierendes G-Protein; $G_{q/11}$: Phospholipase C β -stimulierendes G-Protein; AC: Adenylylcyclase, PLC: Phospholipase C.

Die Adenosinrezeptoren besitzen aufgrund ihrer neuroprotektiven Eigenschaften eine wichtige Rolle im zentralen Nervensystem (ZNS) sowie bei der Regulierung des Herz-Kreislauf-Systems [34, 41]. So gleichen sie unter anderem Sauerstoffschwankungen in den Zellen aus und schützen diese vor Schäden. Im Gegensatz zum A_{2A} -Subtyp, welcher durch seine Aktivierung zu einer höheren Aufnahme von Sauerstoff in einer Zelle führt, bewirkt die Erregung der A_1 -Rezeptoren eine Verringerung der Sauerstoffnachfrage. Dies ist bedingt durch die mit der Sauerstoffveränderung einhergehenden Veränderungen des Energiehaushalts der Zelle. Wird mehr Energie benötigt, so entsteht durch die Umsetzung des ATP mehr

Adenosin, welches die Adenosinrezeptoren aktiviert, die Sauerstoffnachfrage reduziert und so die Energiebalance wieder herstellt. Durch diesen Rückkopplungsmechanismus können Zellen bei vorübergehenden Schwankungen im Sauerstoffhaushalt vor Schäden geschützt werden [41].

Die Aktivierung von Adenosin A₁-Rezeptoren im ZNS führt durch deren Wirkung auf die Calcium- und Kaliumionenkanäle und die damit verbundene Inhibierung der neuronalen Kommunikation zu einer Reduzierung der Ausschüttung von Neurotransmittern wie Glutamat, Dopamin, Serotonin, Norepinephrin, GABA sowie Acetylcholin [42, 43]. Auf diese Weise steuern die Rezeptoren die neuronale Aktivität und schützen die Nervenzellen [41]. Kommt es beispielsweise zu einer Hypoxie in den Zellen, so entsteht eine Depolarisation der Zellmembran und Calciumkanäle werden geöffnet. Es strömen Calciumionen in die Zelle, wodurch es über weitere Folgereaktionen zum Zelltod kommen kann. Gleichzeitig werden bei dem Sauerstoffmangel jedoch die A₁- und A₃-Adenosinrezeptoren aktiviert. Dies führt über die Verminderung der Aktivität der Glutamatrezeptoren zu einer geringeren Membranpolarisation und somit zu einem verminderten Calcium-Einstrom in die Zellen. Damit kann der Zelltod verhindert oder zumindest verzögert werden [44]. Dies sind nur zwei Beispiele zur neuroprotektiven Funktion der Adenosinrezeptoren.

Eine Änderung der Rezeptordichte der Adenosin A₁-Rezeptoren wird daher als eine Ursache verschiedener neurologischer und neurodegenerativer Krankheiten wie Alzheimer [45] oder Epilepsie [46] diskutiert. Hier bietet sich über die Darstellung von radioaktiv markierten A₁-Rezeptorantagonisten die Möglichkeit, die entsprechenden Rezeptoren zu lokalisieren und ihre Dichten *in vivo* darzustellen, um einen möglichen Zusammenhang zu den Erkrankungen zu erkennen und diesen gegebenenfalls über PET-Messungen zur Diagnose nutzen zu können [42, 47]. Zu diesem Zweck wurden bereits radiomarkierte Adenosin A₁-Rezeptorantagonisten entwickelt und präklinisch evaluiert (vgl. Kap. 1.3.2) [42, 47, 48].

Weiterhin ist die Abnahme der Rezeptordichte der Adenosin A₁-Rezeptoren im Gehirn als eine Folge von zerebraler Ischämie bekannt [49]. Hier bietet die Entwicklung von Adenosinrezeptorliganden des A₁-Subtyps für die PET eine Möglichkeit, das Ausmaß der erfolgten Schädigung zu untersuchen [47].

Über zerebrale Anwendungen hinaus könnte die Entwicklung neuer, affinerer und selektiverer Liganden für die Adenosinrezeptoren in der Peripherie zudem eine große Bedeutung besitzen, zum Beispiel für Diagnosen am Herzen [47]. Hier inhibiert das Adenosin die Erregung des Sinusknotens (SV-Knoten) und die Übertragung der Erregung zum Atrioventrikularknoten (AV-Knoten). Dadurch könnten zum Beispiel Adenosinrezeptor-

agonisten zur Behandlung von supraventrikulären Tachykardien verwendet werden [50]. In der *in vivo* Diagnostik über PET können die Annahmen geprüft werden, ob Defekte an den Adenosinrezeptoren für das Sick-Sinus-Syndrom [51] sowie für Konduktionsdefekte bei kardialer Ischämie [52] verantwortlich sind.

1.3.2 Adenosin A₁-Rezeptorliganden für die Positronen-Emissions-Tomographie

PET-Studien mit radioaktiv markierten Adenosinrezeptorliganden besitzen somit hinsichtlich ihrer oben ausgeführten wichtigen Rolle eine große Bedeutung zur Untersuchung der Verteilung der Rezeptoren sowie zur Bestimmung ihrer Konzentration im Gehirn [47]. Wie oben bereits erwähnt (vgl. Kap. 1.3.1), können sie ebenfalls dazu beitragen, Annahmen über Zusammenhängen zwischen neurodegenerativen Erkrankungen und einer veränderten Adenosinrezeptordichte im Gehirn zu prüfen [42, 47].

Bei allen bisher für PET-Untersuchungen evaluierten Adenosinrezeptorliganden handelt es sich um Antagonisten. Ein Grund hierfür ist, dass der Rezeptor für die Bindung eines Agonisten an ein G-Protein gekoppelt sein muss, wobei sich allerdings immer nur ein Teil der Rezeptoren im gekoppeltem Zustand befindet [47]. Ein weiterer Grund besteht darin, dass Adenosin und die meisten seiner Derivate nicht nur reine Rezeptoragonisten sind, sondern dass es sich bei diesen darüber hinaus um Substrate für Membrantransporter oder die Adenosinkinase in den Zellen handelt. Dadurch werden die Liganden, welche extrazellulär an die Rezeptoren binden sollen, in den Zellen gebunden und dessen Konzentration wird reduziert. Gleichzeitig kommt es so zu einer hohen unspezifischen Anreicherung des Radioliganden, welche eine Visualisierung der Rezeptoren über PET erschwert [47].

Als Leitstruktur zur Darstellung möglicher Antagonisten für den Adenosin A₁-Rezeptor wurde das Xanthin Koffein herangezogen. Hierbei handelt es sich um einen affinen Antagonisten für den Adenosinrezeptor, welcher besonders aufgrund seiner anregenden Wirkung weltweit konsumiert wird [53]. Bisher wurden erst wenige geeignete Adenosin A₁-Rezeptorliganden radiomarkiert.

Der erste für PET-Studien entwickelte Ligand für diesen Rezeptor-Subtyp ist das [¹¹C]KF15372 (8-Dicyclopropylmethyl-1-(1-[¹¹C]-propyl)-3-propylxanthin; vgl. Abbildung 6) [54]. Die Radiosynthese dieser Verbindung erfolgte ausgehend von [¹¹C]Kohlenstoffdioxid. Dieses wurde mit Ethylgringard zu [1-¹¹C]Propionsäure umgesetzt, die Darstellung des [1-¹¹C]-1-Iodpropan gelang daraus durch Reduktion zum [1-¹¹C]Propanol und anschließende Reaktion mit Iodwasserstoff. Durch Alkylierung des 8-Dicyclopropylmethyl-3-propylxanthins

konnte damit das gewünschte radioaktiv markierte Produkt mit einer radiochemischen Ausbeute von 5 % und einer Syntheszeit von ca. 50 Minuten erhalten werden. Die radiochemische Reinheit des [^{11}C]KF15372 betrug hierbei > 99 %. Die erreichte molare Aktivität variierte zwischen 10 und 56 GBq/ μmol [47, 54]. Bei *in vivo* Studien an Mäusen lag das Maximum der Aktivität im Gehirn fünf Minuten nach intravenöser Injektion bei 1,9 % der Injektionsdosis. Eine Anreicherung wurde im Hippocampus, im Cortex, im Cerebellum sowie im Striatum beobachtet, also in Regionen im Gehirn, welche eine hohe Adenosin A_1 -Rezeptordichte besitzen [55]. Durch Gabe eines nicht radioaktiv markierten Adenosin A_1 -Rezeptorliganden (KF15372 und DPCPX) wurde die Radioaktivität im Gehirn um 57 % vermindert. Die Verbindung zeigt somit eine reversible und rezeptorspezifische Aufnahme im Gehirn, gleichzeitig jedoch einen nicht tolerierbaren großen Anteil an unspezifischer Bindung [47, 54, 56].

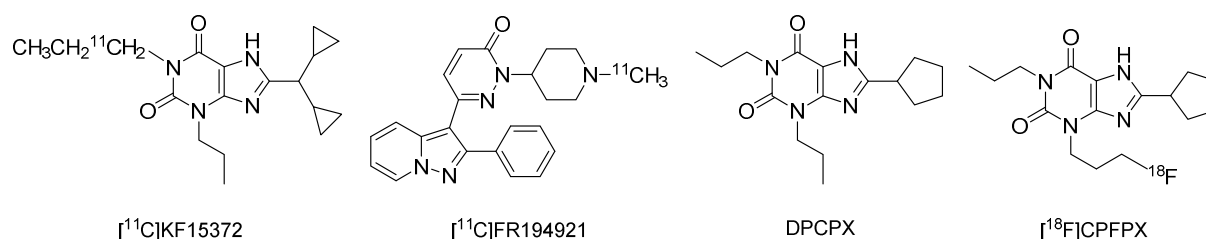


Abbildung 6: Molekülstrukturen der Adenosin A_1 -Rezeptorliganden [^{11}C]KF15372, [^{11}C]FR194921, DPCPX und [^{18}F]CPFPX [42].

Mit der Verbindung [^{11}C]FR194921 wurde ein weiterer ^{11}C -markierter, selektiver A_1 -Rezeptorantagonist entwickelt, welcher keine Xanthinstruktur besitzt (vgl. Abbildung 6) [57]. Die Radiosynthese erfolgte ebenfalls ausgehend von [^{11}C]Kohlenstoffdioxid. Nach erfolgter Reduktion wurde es mit Iodwasserstoff zum [^{11}C]Methyliodid umgesetzt. Hiermit erfolgte eine Methylierung des Demethyl-FR194921 zum gewünschten Radioliganden. Er konnte mit einer radiochemischen Ausbeute von 38 % und einer Reinheit von > 99 % synthetisiert werden. Die molare Aktivität betrug 18 - 32 GBq/ μmol [57]. Der Radioligand zeigte bei *in vivo* Studien an Ratten eine rezeptorspezifische Aufnahme im Gehirn. Durch die Gabe von DPCPX als nicht radioaktivem Liganden konnte die Aktivität im Gehirn nur um 50 % reduziert werden, somit besitzt auch dieser Radioligand ein vergleichsweise hohes unspezifisches Bindungspotential. In PET-Studien an Affen wurde als Maximum der Radioaktivität im Gehirn 30 Minuten nach intravenöser Injektion eine Anreicherung von 0,03 % i.D./g gefunden, die jedoch erst nach einer Zeit von weiteren 60 Minuten wieder langsam abnahm [57]. Bedingt durch die geringe Halbwertszeit des Radionuklids von 20,4 Minuten [2], ist somit das Zeit-

fenster zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten des Ligand-Rezeptor-Komplexes mit 60 - 90 Minuten zu gering [42].

Die beiden oben genannten ^{11}C -markierten Radionuklide sind jedoch aufgrund ihrer geringen spezifischen Aktivitäten und der im Vergleich zu ^{18}F -markierten Verbindungen deutlich kürzeren physikalischen Halbwertszeit des Kohlenstoff-11 nicht gut zur Visualisierung der Adenosin A_1 -Rezeptoren *in vivo* geeignet.

Mit der Entwicklung des 1,3-Dipropyl-8-cyclopentylxanthin (DPCPX; vgl. Abbildung 6) und der Darstellung seiner radioaktiv markierten Form als $[^3\text{H}]\text{DPCPX}$ ist es gelungen, einen hochaffinen und selektiven Adenosin A_1 -Rezeptorantagonisten für *in vitro* Studien zu erhalten, welcher auch aufgrund seiner hohen erreichbaren spezifischen Aktivität besonders gut zur Darstellung der A_1 -Rezeptoren geeignet ist [58, 59]. Durch Einführung eines Fluoratoms in die 3-Propylgruppe konnte auf der Grundlage des DPCPX das 8-Cyclopentyl-3-(3-fluorpropyl)-1-propylxanthin (CPFPX) entwickelt werden [60]. Die Radiofluorierung zum $[^{18}\text{F}]\text{CPFPX}$ (vgl. Abbildung 6) erfolgte über eine nukleophile Substitution mit n.c.a. $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ an 8-Cyclopentyl-7-pivaloyloxymethyl-1-propyl-3-(3-tosyloxypropyl)xanthin und anschließende Hydrolyse der Pivaloyloxymehtylschutzgruppe. Hierbei konnten radiochemische Ausbeuten von 55 % und eine Reinheit von > 98 % erhalten werden. Die molare Aktivität der radiofluorierten Verbindung betrug mehr als 270 GBq/ μmol [47].

In vivo Studien an Mäusen wiesen ein Maximum der Aktivität im Gehirn fünf Minuten nach intravenöser Injektion von 2,5 % der Injektionsdosis auf. Die Gabe des nicht radioaktiv markierten, hoch affinen Adenosin A_1 -Antagonisten DPCPX verringerte die Radioaktivität des $[^{18}\text{F}]\text{CPFPX}$ im Gehirn um 60 - 70 %. Ein Metabolismus der Verbindung im ZNS fand nur in geringem Maße statt, so dass nach 60 Minuten noch mehr als 98 % des $[^{18}\text{F}]\text{CPFPX}$ intakt waren. Im Gegensatz dazu wurden im Blut relativ schnell zwei polare Metabolite gebildet [47]. PET-Untersuchungen an Pavianen zeigten ebenfalls eine hohe Aktivität in den für Adenosin A_1 -Rezeptoren typischen Regionen, und eine Verdrängung durch einen kalten Liganden führte regionsabhängig zu einer 63 - 100 %-igen Abnahme der Radioaktivität [61, 62].

Dies zeigt, dass es sich beim $[^{18}\text{F}]\text{CPFPX}$ ebenfalls um einen hoch affinen und selektiven Antagonisten für den Adenosin A_1 -Rezeptor handelt, so dass er mittlerweile einen wichtigen Radioliganden für die PET zur Untersuchung der Adenosin A_1 -Rezeptoren im ZNS darstellt [62]. Er wird bereits routinemäßig in der Schlafforschung [63, 64] sowie in der klinischen Forschung [65-69] angewendet. Ein großer Nachteil dieser Verbindung ist jedoch sein schneller Metabolismus *in vivo*, wodurch seine biologische Halbwertszeit im menschlichen

Blutplasma mit etwa 10 Minuten sehr gering ist [70]. Der Radioligand ist zwar zur Untersuchung des ZNS geeignet, da die Metabolite die Blut-Hirn-Schranke nicht durchdringen können, jedoch ist die Darstellung der Adenosin A₁-Rezeptoren in anderen Organen mittels PET aufgrund der unspezifischen Bindungen durch die Metabolite stark begrenzt [47].

1.4 Bindungsstudien mit Radioliganden

Bindungsstudien dienen dazu, Aussagen über die Affinität sowie die spezifische Bindung von (Radio-)Liganden an bestimmte Rezeptoren zu erhalten. Bei der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung handelt es sich in der Regel um ein reversibles chemisches Gleichgewicht. Dieses kann über Gleichung 2 beschrieben werden [71].



Dabei steht [L] für die Konzentration des entsprechenden (Radio-)Liganden, [R] für die des Rezeptors und [LR] für die des Ligand-Rezeptor-Komplexes. Von diesen Größen kann ausschließlich die des rezeptorgebundenen Radioliganden in den Bindungsstudien bestimmt werden. Die Variablen k_{on} und k_{off} stehen für die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- bzw. der Rückreaktion. Für die Durchführung von Bindungsstudien müssen folgende Kriterien erfüllt werden:

- Der (Radio-)Ligand geht mit dem Rezeptor eine reversible Bindung ein, sobald sie aufeinander treffen. Die Reaktionsgeschwindigkeit (v_{hin}) der Assoziation der Ligand-Rezeptor-Komplexe lässt sich beschreiben durch:

$$v_{\text{hin}} = [L] \cdot [R] \cdot k_{\text{on}} \quad (3)$$

- Die Bindung des (Radio-)Liganden darf dabei die Affinitätseigenschaften der Bindungsstellen des Rezeptors nicht verändern.
- Die Affinität des (Radio-)Liganden zum entsprechenden Rezeptor bestimmt die Dauer der Bindung. Die Reaktionsgeschwindigkeit ($v_{\text{rück}}$) der Dissoziation des Ligand-Rezeptor-Komplexes ist gegeben durch:

$$v_{\text{rück}} = [LR] \cdot k_{\text{off}} \quad (4)$$

- Das chemische Gleichgewicht ist erreicht, wenn die Reaktionsgeschwindigkeiten der Hin- und der Rückreaktion gleich groß sind.

$$v_{\text{hin}} = v_{\text{rück}} \quad (5)$$

$$[L] \cdot [R] \cdot k_{\text{on}} = [LR] \cdot k_{\text{off}} \quad (6)$$

Die Dissoziationskonstante K_D eines Radioliganden entspricht dessen Konzentration, bei der im Gleichgewicht die Hälfte der Bindungsstellen des Rezeptors besetzt ist. Sie ist nach dem Massenwirkungsgesetz definiert als:

$$K_D = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} = \frac{[L][R]}{[LR]} \quad (7)$$

Sie stellt ein Maß für die Affinität des Radioliganden zum Rezeptor dar und kann auf verschiedenen Wegen ermittelt werden. Zum einen kann der K_D -Wert über die Konzentrationen des Radioliganden bei Sättigungsexperimenten bestimmt werden. Ein weiteres Verfahren stellt dessen Ermittlung über die Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} dar [71].

1.4.1 Sättigungsexperimente

Mittels Sättigungsexperimenten können die Affinität eines Radioliganden zu einem Rezeptor über die Dissoziationskonstante K_D und die maximale Anzahl der vorhandenen Rezeptoren B_{max} ermittelt sowie das Ausmaß der unspezifischen Bindung des Radioliganden untersucht werden [71].

Da die Anzahl der freien Rezeptoren im Gleichgewicht zur Ermittlung der Dissoziationskonstante nicht bestimmt werden kann, wird die Gesamtzahl der vorhandenen Rezeptoren verwendet. Diese entspricht der Konzentration der freien Rezeptoren ($[R]$) zuzüglich des durch Liganden besetzten Rezeptoranteils ($[LR]$), wobei letzteres häufig durch B (Konzentration des gebundenen Anteils) bezeichnet wird.

$$B_{\text{max}} = [R] + B \quad (8)$$

Durch Kombination der Gleichungen 7 und 8 ergibt sich die Konzentration der über spezifische Bindungen im Ligand-Rezeptor-Komplex gebundenen Rezeptoren mit der Korrelation der freien Liganden $[L]$. Diese Beziehung wird als Bindungsisotherme bezeichnet.

$$B = \frac{B_{\text{max}} \cdot [L]}{K_D + [L]} \quad (9)$$

Erreicht die Konzentration des Radioliganden diejenige des K_D -Werts ($[L] = K_D$), so entspricht die Konzentration des Ligand-Rezeptor-Komplexes der halben Konzentration der vorhandenen Bindungsstellen.

Zur experimentellen Bestimmung des K_D -Werts müssen zunächst die spezifische Bindung sowie die Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen B_{\max} für die Rezeptorliganden ermittelt werden. Dies geschieht, indem die Totalbindung sowie die unspezifische Bindung eines Radioliganden an den Membranenrezeptoren bestimmt werden.

Die konzentrationsabhängige Totalbindung des Radioliganden wird durch Inkubation an den zu untersuchenden Rezeptoren erhalten. Die relative Anzahl der Bindungen kann über die Aktivitäten des anschließend an den Zellen haftenden Radioliganden gemessen werden. Aufgetragen gegen die Radioligandkonzentration steigt die Bindung zu Beginn stark an, mit steigender Konzentration flacht die Kurve jedoch leicht ab verläuft zunehmend linear (vgl. Abbildung 6). Der Anteil der unspezifischen Bindung an der Totalbindung wird ermittelt, indem der Radioligand bei der Inkubation von einem affinen, selektiv bindenden nicht-radioaktiven Liganden in hohem Überschuss von den Rezeptorbindungsstellen verdrängt wird. In der Regel nimmt der Anteil der unspezifischen Bindung mit zunehmender Radioligandkonzentration linear zu (vgl. Abbildung 7).

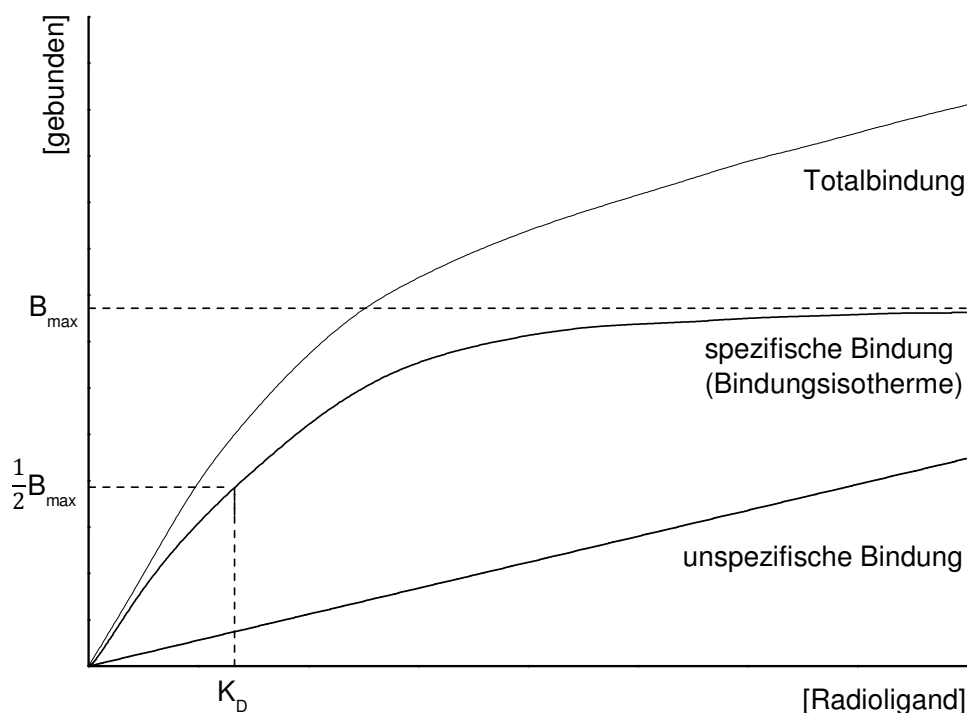


Abbildung 7: Schematische Kurve eines Sättigungsexperiments eines Radioliganden bei Rezeptorüberschuss.

Die spezifische Bindung des Radioliganden wird dann durch Subtraktion der unspezifischen von der Totalbindung erhalten. Die konzentrationsabhängige Kurve besitzt die Form einer Hyperbel und geht bei großen Konzentrationen in eine Sättigung über (vgl. Abbildung 6). Der Sättigungswert entspricht hierbei den maximal vorhandenen Bindungsstellen [71]. Die Umformung von Gleichung 9 ermöglicht eine linearisierte Auftragung der Bindungsdaten als sogenannten Scatchard-Plot (Gleichung 10), mit der die Dissoziationskonstante aus der Steigung der erhaltenen Geraden bestimmt werden kann [72]. Die vorhandene Rezeptoranzahl ergibt sich aus dem y-Achsenabschnitt.

$$\frac{B}{[L]} = -\frac{1}{K_D}B + \frac{B_{\max}}{K_D} \quad (10)$$

Heutzutage findet die Bestimmung der Dissoziationskonstanten sowie der maximalen Anzahl der Bindungsstellen weitgehend über computergestützte nicht-lineare Regressionsrechnungen statt.

1.4.2 Kinetische Experimente

Wie oben bereits erwähnt (vgl. Kap. 1.4), kann die Dissoziationskonstante des Radioliganden auch kinetisch aus den Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} der Assoziation bzw. der Dissoziation des Ligand-Rezeptor-Komplexes bestimmt werden (Gleichung 7).

Die Geschwindigkeitskonstante der Bildung des Komplexes k_{on} wird ermittelt, indem die spezifische Bindung des Radioliganden an den Rezeptor zu verschiedenen Zeitpunkten beobachtet wird. Die Berechnung der Konstanten kann anschließend auf drei Arten geschehen. Zum einen erfolgt eine vollständige Lösung unter Betrachtung der Hin- und der Rückreaktion. Ein Nachteil ist hier, dass zusätzlich die Anzahl bzw. die Konzentration der vorhandenen Rezeptorbindungsstellen B_{\max} über ein zusätzliches Sättigungsexperiment bestimmt werden muss [71]. Bei der Behandlung der Assoziation des Ligand-Rezeptor-Komplexes als Reaktion 2. Ordnung wird nur die Anfangsgeschwindigkeit der Bildung berücksichtigt und der Einfluss der Dissoziation auf die spezifische Bindung des Radioliganden vernachlässigt. Auch hier wird zusätzlich B_{\max} zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten benötigt [71]. Ein weiterer Weg, die Assoziationskonstante zu bestimmen, besteht darin, die Dissoziation des Komplexes in die Betrachtung mit einzubeziehen, die Konzentration des Radioliganden jedoch als konstant anzusehen. Hierzu muss der Radioligand im Gegensatz zum Sättigungsexperiment in großem Überschuss eingesetzt werden, damit seine Konzentration stets um einiges größer ist als die des gebundenen Liganden und sich durch Bindungen der Ligandmoleküle zum Rezeptor praktisch nicht verändert. Ein

Vorteil dieser Methode ist, dass die Gesamtzahl der Bindungsstellen nicht bestimmt werden muss [71]. Die Änderung der Anzahl der Bindungen ist gegeben durch:

$$\frac{dB}{dt} = k_{on} \cdot [L] \cdot [R] - k_{off} \cdot B \quad (11)$$

Die Konzentration der freien Rezeptoren kann nach Gleichung 8 durch Bindungsparameter substituiert werden. Es folgt:

$$[R] = B_{max} - B \quad (12)$$

Aus Kombination der Gleichungen 11 und 12 ergibt sich:

$$\frac{dB}{dt} = k_{on} \cdot [L] \cdot (B_{max} - B) - k_{off} \cdot B \quad (13)$$

Mit

$$k'_{on} = [L] \cdot k_{on} \quad (14)$$

und B_e als Anzahl der im Gleichgewicht besetzten Rezeptoren folgt:

$$\frac{dB}{dt} = (k'_{on} + k_{off}) \cdot (B_e - B) \quad (15)$$

Durch Umstellen folgt daraus:

$$\frac{dB}{(B_e - B)} = (k'_{on} + k_{off}) \cdot dt \quad (16)$$

Durch Integration ergibt sich:

$$\ln \frac{1}{(B_e - B_t)} = (k'_{on} + k_{off}) \cdot t = k_{ob} \cdot t \quad (17)$$

mit

$$k_{ob} = k'_{on} + k_{off} \quad (18)$$

Durch eine Auftragung von $\ln(1/(B_e - B_t))$ gegen die Zeit kann k_{on} aus der Steigung der entstehenden Geraden nach Bestimmung von k_{off} aus den entsprechenden Dissoziationsversuchen über Gleichung 19 ermittelt werden.

$$k_{on} = \frac{(k_{ob} - k_{off})}{[L]} \quad (19)$$

Die Dissoziation des Ligand-Rezeptor-Komplexes entspricht einer Reaktion 1. Ordnung. Der Einfluss der Bildung des Komplexes wird hier vernachlässigt. Die Rezeptoren werden mit dem Radioliganden bis zur Gleichgewichtseinstellung inkubiert. Anschließend wird entweder

der Inkubationsansatz um das 100-fache oder mehr verdünnt, oder es wird ein Überschuss eines nicht radioaktiv markierten Liganden zugegeben, um alle Bindungsstellen nach Dissoziation des Komplexes durch diesen zu besetzen. In beiden Fällen ist die Wahrscheinlichkeit einer erneuten Ausbildung der Ligand-Rezeptor-Bindung nach erfolgter Dissoziation sehr gering, weshalb diese Reaktion vernachlässigt werden kann [71]. Die Änderung der Bindungen ist dann gegeben durch:

$$\frac{dB}{dt} = -k_{\text{off}}B \Leftrightarrow \frac{dB}{B} = -k_{\text{off}} \cdot dt \quad (20)$$

Durch Integration folgt:

$$\ln \frac{B_t}{B_0} = -k_{\text{off}} \cdot t \quad (21)$$

Hierbei ist B_0 die Anzahl der zum Zeitpunkt $t = 0$ im Gleichgewicht vorhandenen Bindungen.

Durch eine Auftragung von $\ln(B/B_0)$ gegen die Zeit kann die Dissoziationskonstante durch Multiplikation mit -1 direkt aus der Steigung der resultierenden Geraden ermittelt werden.

1.4.3 Konkurrenzexperimente

Konkurrenzassays dienen dazu, Aussagen über die Affinität verschiedener Ligandmoleküle zu den gewünschten Rezeptortypen zu erhalten, ohne dass diese dafür radioaktiv markiert werden müssen. Bei diesem Experiment wird ein zum Rezeptor affiner Radioligand mit bekanntem K_D -Wert in konstanter Konzentration zur Inkubation der Rezeptoren vorgelegt. Im Gegensatz zu der oben genannten kinetischen Bestimmung des K_D -Werts werden hier die Konzentrationen des konkurrierenden Radioliganden nach Einstellung des Gleichgewichts ermittelt. Die zu untersuchende Substanz wird in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Diese konkurriert mit dem Radioliganden um die Bindungsplätze der Rezeptoren. Je größer die Konzentration und die Affinität des unmarkierten Liganden ist, desto geringer wird die Zahl der Bindungen des Radioliganden an den Rezeptoren. Durch eine halb-logarithmische Auftragung der Bindung des Radioliganden in Abhängigkeit von der Konzentration des nicht radioaktiven Liganden wird eine sigmoide Dosis-Wirkungs-Kurve erhalten (vgl. Abbildung 8) [71].

Bei geringen Konzentrationen des untersuchten Liganden wird der Radioligand nicht von den Bindungsstellen verdrängt. Es entsteht ein Plateau in der Kurve, welches die Totalbindung des Radioliganden darstellt. Mit steigender Menge des Liganden wird ein immer größerer Teil der radioaktiven Verbindung verdrängt, bis diese nur noch an den unspezifischen Stellen

an den Membranen und an der Matrix haftet. Dies entspricht dem unteren Plateau der Kompetitionskurve. Der Wendepunkt der Kurve spiegelt den IC_{50} -Wert wieder (inhibitory concentration 50 %). Er gibt die Konzentration des zugegebenen Liganden an, an dem dieser den Radioliganden von der Hälfte der spezifischen Bindungsstellen verdrängt hat [71]. Dieser Wert ist annähernd proportional zur Dissoziationskonstanten des Inhibitors (K_i). Je kleiner der IC_{50} -Wert, desto kleiner ist auch die Dissoziationskonstante, somit handelt es sich um einen affineren Liganden. Die Konzentration des Radioliganden besitzt hierbei ebenfalls einen Einfluss auf den IC_{50} -Wert. Dieser wird mit steigender Radioligandenkonzentration größer, da eine größere Menge der nicht markierten Menge zur Verdrängung benötigt wird.

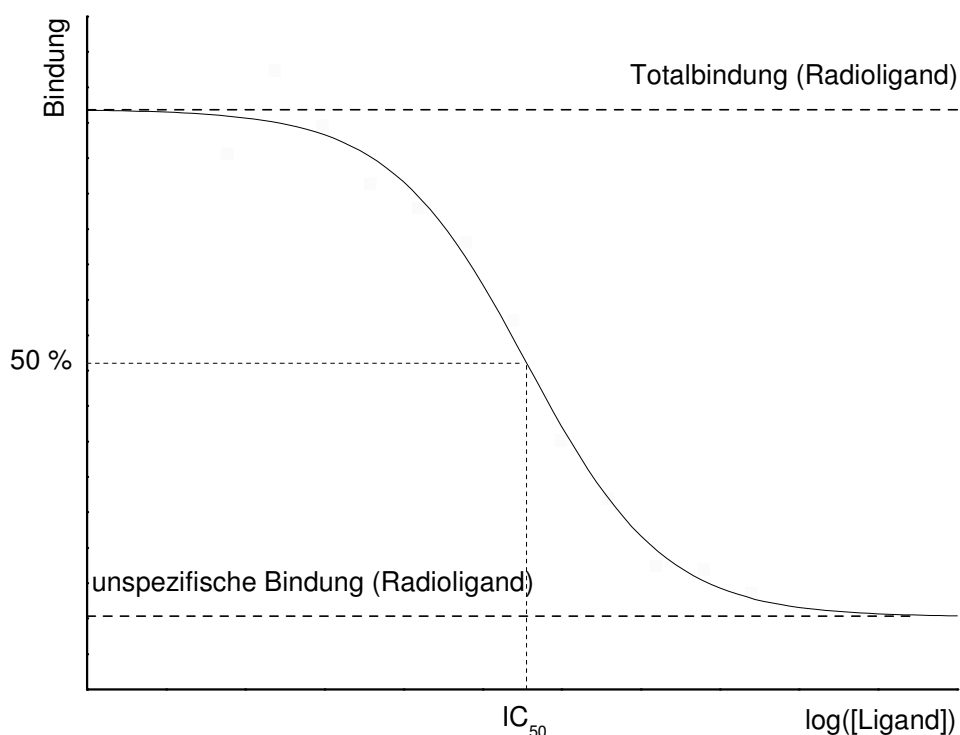


Abbildung 8: Schematische Kompetitionskurve eines Radioliganden mit der zu untersuchenden Verbindung.

Die Dissoziationskonstante des Inhibitors, also des zu untersuchenden Liganden, kann näherungsweise nach Cheng und Prusoff entsprechend Gleichung 22 ermittelt werden [73]. Die Bestimmung des IC_{50} -Werts sowie der Dissoziationskonstanten des Liganden erfolgt meist computergestützt über nicht lineare Regressionsrechnungen.

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[Radioligand]}{K_D(Radioligand)}} \quad (22)$$

Idealerweise sind der K_D - sowie der K_I -Wert einer Verbindung gleich groß. Dies ist in der Realität jedoch nicht der Fall, da die unspezifische Bindung des Liganden bei der Bestimmung von K_I -Werten nicht berücksichtigt wird. Somit stellen diese nur ein relatives Maß für die Affinität von Liganden zum Rezeptor dar, welche untereinander verglichen werden können, jedoch weniger exakt als K_D -Werte sind.

1.5 Funktionelle Assays zur Untersuchung von GPCR-Liganden

Funktionelle Assays an G-Protein gekoppelten Rezeptoren dienen der Bestimmung der effektiven Wirkkonzentrationen (EC_{50} -Werte) von Ligandmolekülen am untersuchten Rezeptortyp. Hierüber können Aussagen darüber erhalten werden, in welchem Umfang die Ligandmoleküle durch ihre Bindung die GPCR aktivieren. Da die aktivierten GPCR verschiedene Weiterleitungssysteme steuern, kann der Effekt, welcher durch die Ligandmoleküle hervorgerufen wird, durch Beobachtung verschiedener Faktoren in den Zellen bestimmt werden [74].

Eine Möglichkeit bietet die Beobachtung des Guanintriphosphat-Austauschfaktors (GTP-Austauschfaktor). Hierbei handelt es sich um ein Signalprotein, durch welches das G-Protein des GPCR-Ligandmolekül-Komplexes ein gebundenes Guanindiphosphat (GDP) gegen ein GTP austauscht, um diesen zu aktivieren. Durch Zugabe von ^{35}S -markiertem GTP zu den Zellmembranen und dem zu untersuchendem Rezeptorliganden kann nach Abtrennung und Waschen der Membranen die an diesen haftende Radioaktivität in Abhängigkeit von der Ligandkonzentration bestimmt werden, welche somit ein Maß für die Aktivität des GPCR darstellt [74]. Eine Methode ohne den Zusatz radioaktiv markierter Stoffe erlaubt hier der Einsatz von Europium-markiertem GTP, bei dem die durch äußere Anregung entstehende Fluoreszenz dieser Verbindung nach Isolierung der Zellmembranen gemessen wird [74].

Intrazelluläre Calcium-Assays sind ebenfalls zur Untersuchung der Aktivität der GPCR geeignet. Hier wird die von der Konzentration des Rezeptorliganden abhängige Menge der in den Zellen befindlichen Calcium-Ionen über calciumsensitive fluoreszierende Farbstoffe oder durch die Zugabe von Aequorin bestimmt. Beim Aequorin handelt es sich um ein Photoprotein, welches das Luciferin Coelenterazin beinhaltet. In Gegenwart von Calcium-Ionen geht dieses in einen elektronisch angeregten Zustand über und emittiert nach Relaxation in

den Grundzustand Lichtquanten. Die Änderung der Konzentration des Calciums in den Zellen kann auf unterschiedliche Weise erfolgen, z.B. durch Öffnung der Calciumkanäle in der Plasmamembran, durch die Freisetzung von IP_3 aus intrazellulären Speichern des endoplasmatischen Retikulums oder durch die Aktivierung der GPCR. Daher sollten die einzelnen am Test beteiligten Verbindungen vor Durchführung des Assays auf eine mögliche Wirkung auf den Calciumhaushalt hin geprüft werden [74].

Durch GPCR-vermittelte sekundäre Botenstoffe wie cAMP oder Calcium können in Reporter-gen-Assays ‚Response Elemente‘ inhibiert oder aktiviert werden, welche die Genexpression eines ausgewählten Reporterproteins regulieren. Als Reporter dienen hier gewöhnlich β -Galactosidase, Luciferase, grün fluoreszierende Proteine oder β -Lactamase. Die Aktivierung der GPCR kann damit beispielsweise über ligandkonzentrationsabhängige Lumineszenz oder Fluoreszenz beobachtet werden [74].

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der Aktivierung von GPCR bieten cAMP-Assays. Hierbei wird die Konzentration des durch die Adenylylcyclase (AC) gebildeten cAMPs in Abhängigkeit von der Ligandkonzentration bestimmt. Dies kann beispielsweise über die Kompetition des intrazellulären cAMPs mit radioaktiv markierten [^{125}I]cAMP geschehen. Eine weitere Möglichkeit zur Ermittlung des vorhandenen cAMP bietet die Beobachtung der Lumineszenz bzw. Fluoreszenz bei Zugabe von Substanzen, welche mit cAMP wechselwirken. Während diese Untersuchungsmethode für G_s -gekoppelte Rezeptoren unkompliziert ist, kann es bei G_i -gekoppelten Rezeptoren zu Schwierigkeiten kommen, da durch diese die AC inhibiert und die cAMP-Konzentration verringert wird. Daher müssen hier meist AC-stimulierende Substanzen zugefügt werden [74].

Der cAMP-Glo™ Assay

Für die Bewertung der neuen Adenosin A_1 -Rezeptorliganden im Rahmen dieser Arbeit wurde der cAMP-Glo™ Assay der Firm Promega (Madison, USA) ausgewählt, da dieser eine der aktuellsten zurzeit auf dem Markt verfügbaren Methoden zur Untersuchung von GPCR-Liganden darstellt [75]. Er beruht auf dem Prinzip der Inhibition bzw. Stimulation der AC durch GPCR. Dies wirkt sich direkt auf die Menge des gebildeten cAMPs aus [76]. Eine schematische Darstellung des Assays bei Verwendung von Rezeptoren, welche an G_s -Proteine gekoppelt sind, ist in Abbildung 9 dargestellt.

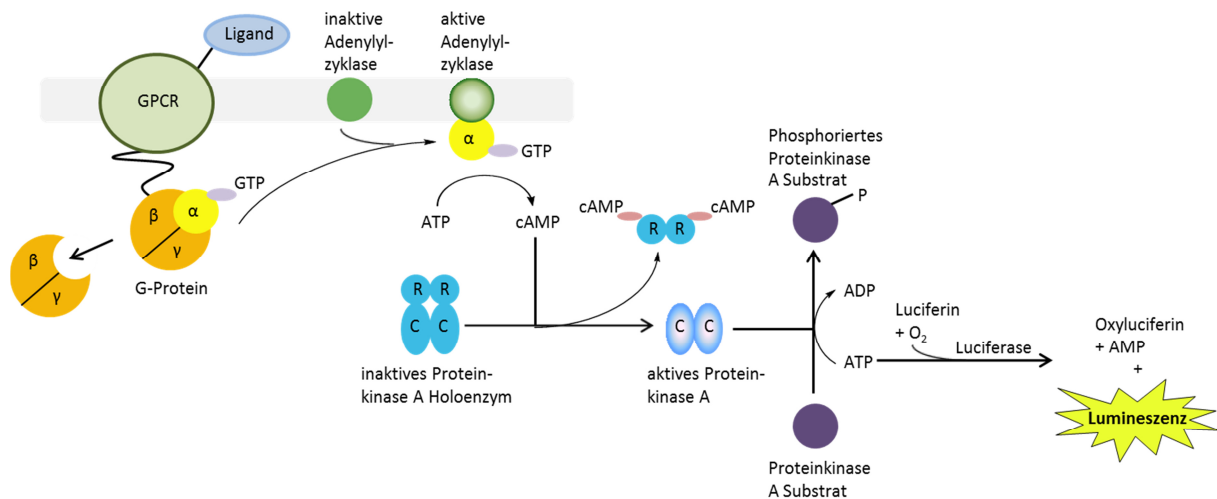


Abbildung 9: Schematische Darstellung des cAMP-Glo™ Assays unter Einsatz von GPCR, bei denen die AC durch die G_α-Einheit stimuliert wird (nach [76]).

Bindet ein extrazellulärer Agonist an den Rezeptor, so ändert sich die Konformation des G-Proteins. Hierdurch dissoziiert es wie oben beschrieben (vgl. Kap. 1.3.1) in eine G_α- und eine G_{βγ}-Untereinheit. Durch die α-Untereinheit wird die AC aktiviert bzw. inhibiert, wodurch die Menge des gebildeten cAMPs reguliert wird. Dieses wiederum aktiviert das im Assay zugegebene Protein Kinase A, welches nun ATP zu ADP umsetzt. Durch das noch vorhandene ATP wird das zugesetzte Luciferin unter Lumineszenz zu Oxyluciferin umgesetzt. Die Stärke der Lumineszenz ist daher abhängig von der Menge des gebildeten cAMPs und somit von der Anzahl der aktivierten Rezeptoren [76].

Bei der Bindung eines Rezeptoragonisten an den A_{2A}-Adenosinrezeptors wird die AC stimuliert (vgl. Kap. 1.3.1) [38]. Dadurch entsteht mehr cAMP in den Zellen, wodurch das Lumineszenzsignal reduziert wird. Bei Zugabe eines Antagonisten zu diesem Rezeptorsubtyp wird das Lumineszenzsignal aufgrund der geringeren Menge an vorhandenem cAMP erhöht.

Bei der Untersuchung des Adenosin A₁-Rezeptors verhält es sich genau umgekehrt. Hier wird die AC durch die Bindung mit einem entsprechenden Agonisten inhibiert (vgl. Kap. 1.3.1) [38] und weniger cAMP gebildet. Dadurch vergrößert sich das Lumineszenzsignal mit zunehmender Ligandenkonzentration. Durch die Zugabe eines A₁-spezifischen Antagonisten wird entsprechend die Inhibierung der AC aufgehoben, was in einer höheren cAMP-Menge und einem niedrigerem Lumineszenzsignal resultiert.

2 Problemstellung

Adenosinrezeptoren stellen die biologischen Targets des natürlich vorkommenden Xanthins Koffein, der weltweit am häufigsten konsumierten legalen Droge, dar. Ligandmoleküle dieses Rezeptors besitzen nicht nur erhebliches therapeutisches Potential, sondern bieten auch in entsprechend radiomarkierter Form große Möglichkeiten in der nuklearmedizinischen, nicht-invasiven bildgebenden Diagnostik mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET).

8-Cyclopentyl-3-(3-[^{18}F]fluorpropyl)-1-propylxanthin ([^{18}F]CPFPX) stellt zurzeit den am besten etablierten Radioliganden für die *in vivo* Bildgebung von Adenosin A_1 -Rezeptoren im zentralen Nervensystem dar. Der selektive und hochaffine Antagonist wird bereits in der klinischen Forschung sowie der Schlafforschung angewendet. Aufgrund seiner relativ geringen biologischen Halbwertszeit im humanen Blutplasma ist der Radioligand jedoch nicht optimal für ausgedehntere PET-Untersuchungen geeignet.

Daher sollte ein Adenosin A_1 -Rezeptorantagonist entwickelt werden, welcher einem langsameren Abbau durch humane Lebermikrosomen unterliegt, jedoch vergleichbar affin und selektiv wie das CPFPX an den gewünschten Adenosinrezeptor-Subtyp bindet.

Zur Auswahl neuer potentiell affiner und selektiver Adenosin A_1 -Rezeptorliganden sollten die Affinitäten bereits im Haus synthetisierter fluorierter Xanthinderivate zum entsprechenden Rezeptor bestimmt werden. Hierzu musste zunächst die Gleichgewichtsdissoziationskonstante des für die Bindungsexperimente verwendeten tritiierten Radioliganden [^3H]DPCPX über entsprechende Sättigungsexperimente ermittelt werden.

Zusätzlich waren die mittleren effektiven Konzentrationen der oben genannten Xanthinderivate im Hinblick auf ihre Wirkung auf den Adenosin A_1 -Rezeptorsubtyp zu bestimmen. Die Möglichkeit hierzu bietet ein kommerziell erhältlicher Assay zur Bestimmung der ligand-abhängigen cAMP-Konzentrationen in lebenden, den Zielrezeptor exprimierenden Zellen. So war ein möglicher Zusammenhang zwischen der Affinität und der Funktionalität von Xanthinderivaten zum A_1 -Rezeptor zu untersuchen. Aus den so erhaltenen Ergebnissen sollten neue Strukturen konzipiert werden, welche unter Beibehaltung ihres antagonistischen Verhaltens zumindest gleiche, oder verbesserte Eigenschaften in Hinblick auf ihre Affinität und Selektivität zum gewünschten Rezeptor, jedoch eine bessere metabolische Stabilität *in vivo* besitzen.

Auf Grundlage der Ergebnisse aus den Wettbewerbsversuchen sowie aus denen der funktionellen Assays, von im Haus durchgeführten Metabolismusstudien, in der Literatur beschriebenen Eigenschaften ähnlicher Derivate mit Xanthinstruktur und der computer-

gestützten Bestimmung der logP-Werte verschiedener Xanthinderivate waren neue Verbindungen als mögliche Adenosin A₁-Rezeptorliganden auszuwählen, darzustellen und zu evaluieren. Zu deren organisch-präparativer Synthese war weiterhin ein orthogonales Schutzgruppensystem angestrebt, um möglichst viele Derivate darstellen zu können, ohne für die einzelnen Verbindungen einen kompletten, vielstufigen Syntheseweg durchführen zu müssen.

Hinsichtlich der präklinischen Evaluierung der so dargestellten Xanthinderivate ließen sich dann über Konkurrenzexperimente deren Bindungseigenschaften mit denen des CPFPX vergleichen.

Nach erfolgter Synthese entsprechender Vorläuferverbindungen für die Radiomarkierungen waren die trägerarm mit Fluor-18 markierten Zielverbindungen in hoher molarer Aktivität herzustellen und zu isolieren. Mit diesen ermöglichten sich weitere *in vitro* Untersuchungen zur Affinität und Selektivität in Form von autoradiographischen Studien. Mit Hilfe humaner Lebermikrosomen sollte über *in vitro* Metabolismusstudien der Abbau der neuen potentiellen Adenosin A₁-Rezeptorliganden mit dem von CPFPX verglichen werden, um Hinweise auf möglicherweise längere biologische Halbwertszeiten, d.h. höhere metabolische Stabilitäten, dieser Verbindungen im menschlichen Blutplasma zu erhalten.

3 Ergebnisse und Diskussion

Zur Auswahl neuer potentiell affiner und selektiver Adenosin A₁-Rezeptorliganden wurden die Bindungseigenschaften unterschiedlicher im Haus dargestellter Xanthinderivate (vgl. Abbildung 16) bestimmt. Diese sollten mit ihren Effekten auf das Weiterleitungssystem des besagten Rezeptor-Subtyps verglichen werden, um einen möglichen Zusammenhang mit ihren Affinitäten zu erarbeiten. Basierend darauf, sowie auf im Haus durchgeführten Metabolismusstudien und Vergleichen aus der Literatur wurde eine Auswahl an Substituenten für die Synthese von möglicherweise affineren und gleichzeitig metabolisch stabileren A₁-Antagonisten getroffen. Anschließend wurden diese neu konzipierten Xanthinderivate synthetisiert und auf ihre physiologischen Eigenschaften hin untersucht. Nach erfolgreicher Markierung mit Fluor-18 wurden mit den Radioliganden *in vitro* Autoradiographien an Rattenhirnschnitten zur weiterführenden präklinischen Evaluierung durchgeführt.

3.1 Bindungsstudien an humanen Adenosin A₁-Rezeptoren

Die durchgeführten Kompetitionsassays dienten dazu, durch die Bestimmung der Bindungsdissoziationskonstanten (K_i -Werte) Aussagen über die Affinität verschiedener Xanthinderivate an humanen Adenosin A₁-Rezeptoren zu erhalten, welche an Zellmembranen von CHO#38b-Zellen exprimiert waren.

Die hierfür benötigten Zellen der CHO#38b-Zelllinie konnten erfolgreich kultiviert und geerntet werden. Es wurden dabei durchschnittlich $765,4 \pm 102,9$ mg Zellgewebe aus jeweils 40 Petrischalen ($d = 8,5$ cm) erhalten. Durch eine anschließende Proteinbestimmung wurde über den Vergleich mit einer Verdünnungsreihe von Humanserumalbumin erfolgreich das in den Zellpellets befindliche Proteingewicht zu $8193,5 \pm 1303,6$ µg bestimmt. Anschließend wurden die restlichen Zellmembranen aufgearbeitet und entsprechend der benötigten Proteinmenge für die späteren Versuche portioniert. Es wurden je Zellernte bis zu zwölf Portionen für bis zu sechs Kompetitionsversuche erhalten.

Zur Überprüfung der Bindungsversuche mit den Xanthinderivaten an Zellen der CHO#38b-Zelllinie war es sinnvoll, diese zum Vergleich auch an Wildtyp-Zellen der CHO WT-Zelllinie durchzuführen. Es wurden entsprechend 619 mg Zellgewebe aus 40 Petrischalen erhalten, wobei das Proteingewicht zu 5120,0 µg bestimmt wurde. Damit wurden nach der Membranaufarbeitung sechs Portionen für drei Versuche erhalten.

3.1.1 Optimierung der Parameter für die Wettbewerbsassays

Zur Bestimmung der optimal benötigten Proteinmenge für eine möglichst große Dynamik der Bindungsstudien wurden Membransuspensionen unterschiedlicher Konzentrationen hergestellt, mit Agarose vermischt und Portionen mit unterschiedlich großem Proteingehalt lokal auf Gelstreifen aufgetragen („Spots“; vgl. Tabelle 2). Die so vorbereiteten Membran-Agarose-Streifen wurden in [³H]DPCPX-haltiger Pufferlösung inkubiert. Zur Hälfte der Streifen wurde der affine Inhibitor DPCPX als nicht radioaktiver Ligand zum Blockieren der Bindungsstellen der Adenosin A₁-Rezeptoren hinzugegeben.

Tabelle 2: Verwendete Proteinmengen pro Spot.

Ansatz	Membrankonzentration	Proteinmenge pro Spot
A	8 mg/mL	20 µg
B	4 mg/mL	10 µg
C	2 mg/mL	5 µg

In Abbildung 10 sind die Aktivitäten der Ansätze bei Inkubation mit [³H]DPCPX (Totalbindung) sowie nach dem Blockieren der Bindungsstellen mit DPCPX (unspezifische Bindung) dargestellt.

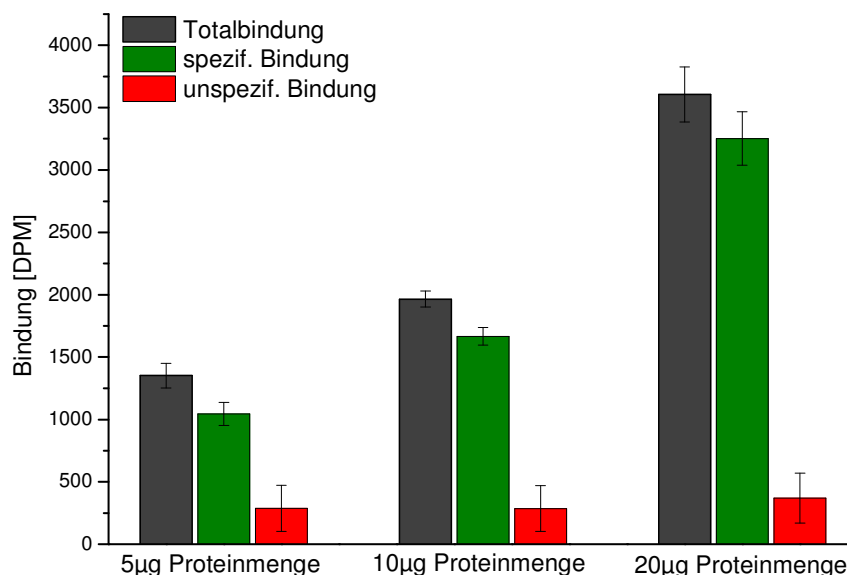


Abbildung 10: Bindung von [³H]DPCPX an Zellmembranen in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge.

Es ist zu erkennen, dass die unspezifische Bindung des Radioliganden mit steigender Membrankonzentration bei $314,8 \pm 109,86$ DPM weitgehend konstant bleibt. Im Gegenzug dazu erhöht sich die Totalbindung linear mit steigender Proteinmenge von $1351,8 \pm 97,7$ DPM auf $3605,0 \pm 220,4$ DPM. Die spezifische Bindung des $[^3\text{H}]\text{DPCPX}$, welche sich aus der Totalbindung abzüglich der unspezifischen Bindung ergibt, nimmt somit mit steigender Proteinkonzentration zu. Die Ergebnisse zeigen, dass die spezifische Bindung des $[^3\text{H}]\text{DPCPX}$ über diesen Versuchsanbau gut erfasst werden kann und der Assay zur Bestimmung der Bindungsdissoziationskonstanten der Xanthinderivate an Zellen, welche den Adenosin A_1 -Rezeptor exprimieren, geeignet ist. Bei Verwendung einer Membrankonzentration von 8 mg/mL entsprechend einer Proteinmenge von 20 μg pro Spot wurde eine spezifische Bindung von $3252,1 \pm 215,2$ DPM erhalten, die eine große Dynamik in den Wettbewerbsversuchen verspricht. Daher wurde diese Konzentration für die späteren Versuche verwendet.

Zur Bestimmung der für die Gleichgewichtseinstellung im Assay benötigte Inkubationszeit wurden Membran-Agarose-Gelstreifen in einer $[^3\text{H}]\text{DPCPX}$ -enthaltenden Pufferlösung inkubiert. Zusätzlich wurde in zwei unterschiedlichen Versuchsreihen nicht radioaktives DPCPX zum Blockieren der Bindungsstellen in verschiedenen Konzentrationen (0,5 nM bzw. 1 μM Endkonzentration) hinzugegeben.

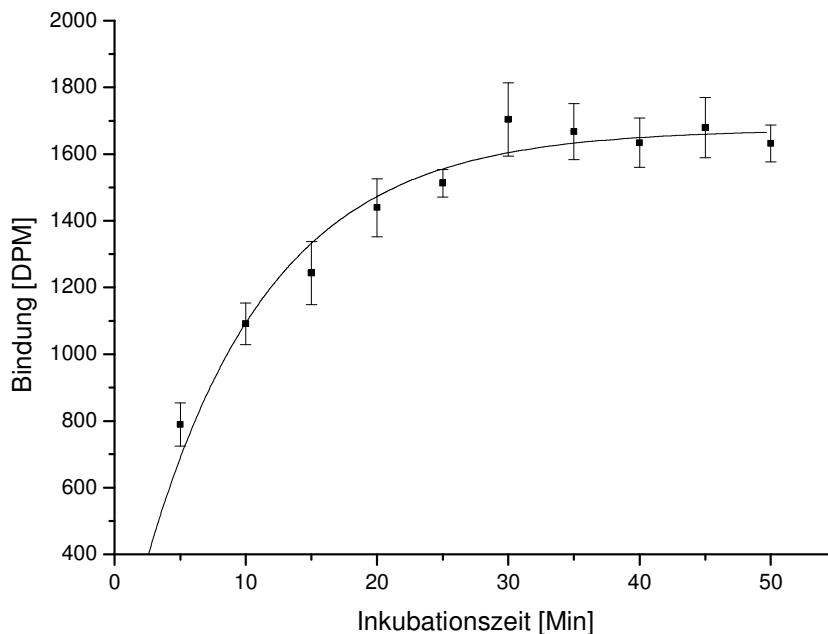


Abbildung 11: Bindung von $[^3\text{H}]\text{DPCPX}$ an Zellmembranen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit 0,5 nM DPCPX als Kompetitor.

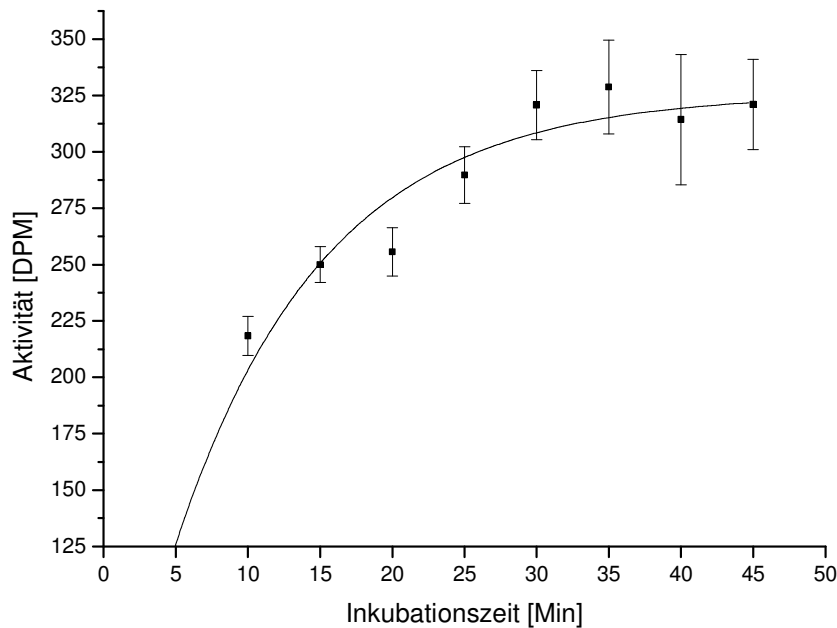


Abbildung 12: Bindung von [³H]DPCPX an Zellmembranen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit 1 μ M DPCPX als Kompetitor.

In den Abbildungen 11 und 12 sind die Aktivitäten des an den Zellmembranen haftenden [³H]DPCPX bei Verwendung von 0,5 nM bzw. 1 μ M DPCPX in Abhängigkeit von der Inkubationszeit graphisch dargestellt. In beiden Fällen steigt die gemessene Tritiumradioaktivität, die der Bindung direkt proportional ist, wie erwartet annähernd exponentiell an und nähert sich asymptotisch einer Sättigung, welche jeweils ab etwa 30 Minuten erreicht ist. Zur Gewährleistung der Gleichgewichtseinstellung wurde daher für alle weiteren Versuche mit einer Inkubationszeit von 35 Minuten gearbeitet.

Ebenfalls essentiell für die aussagekräftige Durchführung der Verdrängungsstudien ist die Auswaschdauer des an den Gelstreifen haftenden, nicht bindenden [³H]DPCPX. Zu deren Bestimmung wurden Membran-Agarose-Gelstreifen in eine 1 nM [³H]DPCPX-Pufferlösung gegeben und für 35 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Streifen unterschiedlich lange in einem bewegten Wasserbad gewaschen. In Abbildung 13 ist zu erkennen, dass die auf den Gelstreifen haftende Menge des tritiierten Liganden zu Beginn stark abnimmt, ab einer Waschzeit von etwa 35 Sekunden jedoch nur noch gering abfällt. Zur Sicherstellung, dass bei den nachfolgenden Versuchen das gesamte ungebundene [³H]DPCPX von den

Gelstreifen abgewaschen wird, wurde mit einer Waschzeit von 60 Sekunden weitergearbeitet.

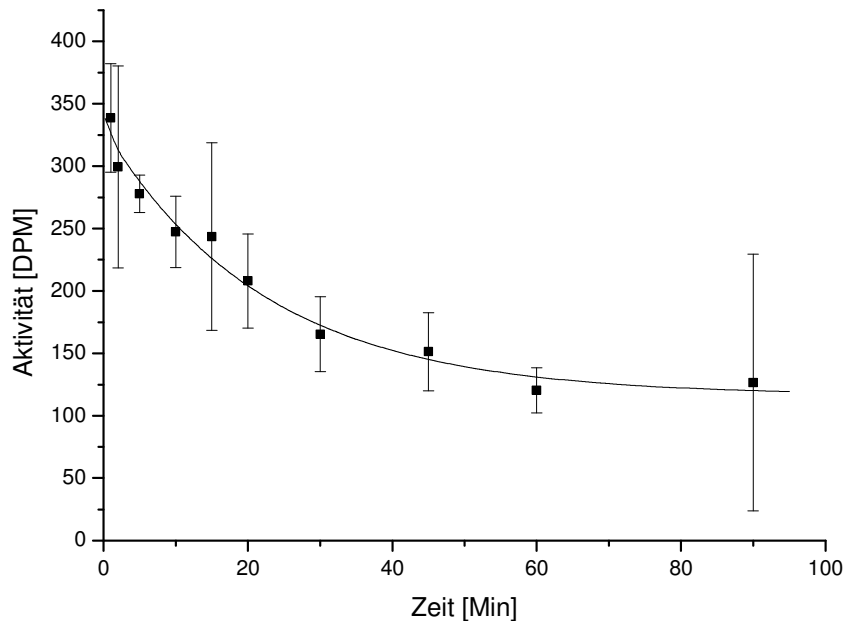


Abbildung 13: Auswaschkinetik der Tritiumradioaktivität aus den Agarose-Gelstreifen.

3.1.2 Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten des $[^3\text{H}]\text{DPCPX}$

Wie in der Einleitung (Kap. 1.4) ausgeführt basiert die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D -Wert) auf dem Massenwirkungsgesetz und gibt die Konzentration des Liganden an, bei der dieser spezifisch und reversibel die Hälfte der vorhandenen Bindungsstellen eines Rezeptors besetzt. Der K_D -Wert des $[^3\text{H}]\text{DPCPX}$ wird dabei benötigt, um die Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Xanthinderivate (K_I -Werte) über den Einsatz des tritiierten Radioliganden zu bestimmen, ohne dass die Xanthine zuvor selbst radioaktiv markiert werden müssen.

Die Sättigungskurve der Totalbindung wurde erhalten, indem die bereits erwähnten Membran-Agarose-Streifen in Pufferlösungen mit verschiedenen Konzentrationen des $[^3\text{H}]\text{DPCPX}$, in diesem Fall zwischen 0,5 und 10 nM, inkubiert und die an den Spots haftenden Tritiumradioaktivitäten in Abhängigkeit von der Konzentration des Radioliganden bestimmt wurden. Die unspezifische Bindung in Abhängigkeit von der freien Konzentration des $[^3\text{H}]\text{DPCPX}$ wurde erhalten, indem nicht radioaktiv markiertes DPCPX der Versuchslösung in konstanter Konzentration (1 μM) zum Blockieren der Bindungsstellen der

A₁-Rezeptoren zugegeben wurde. Abbildung 14 zeigt die Abhängigkeit der drei Bindungsarten von der Konzentration des tritierten DPCPX (Totalbindung = schwarz, unspezifische Bindung = rot, spezifische Bindung = grün). Die erhaltenen Kurvenverläufe entsprechen den in der Einleitung (Kap. 1.4.1) erläuterten theoretischen Erwartungen.

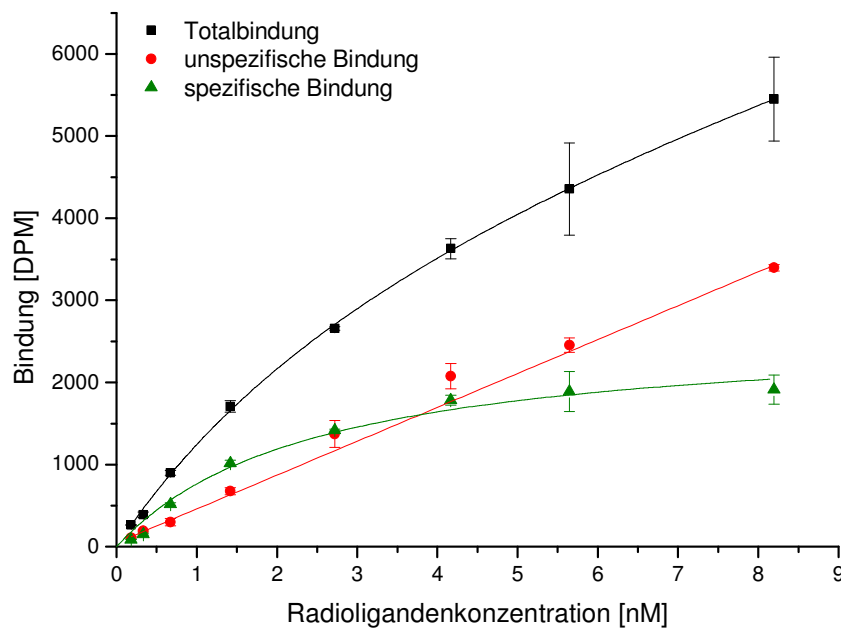


Abbildung 14: Darstellung der spezifischen Bindung des [³H]DPCPX.

Die Bindungsdissoziationskonstante des [³H]DPPX an den Adenosin A₁-Rezeptoren wurde über das Programm GraphPad Prism der Firma GraphPad Software (La Jolla, USA) mittels nicht-linearer Regression zu $K_D = 2,47 \pm 0,27$ nM bestimmt. Dieser Wert zeigt, dass das verwendete [³H]DPCPX eine hohe Affinität zum Adenosin A₁-Rezeptor besitzt und bei kleinen Konzentrationen des Radioliganden zwischen spezifischer Bindung und Untergrund unterschieden werden kann. Der Literatur sind K_D -Werte von 1,2 nM [77] bzw. 3,9 nM [78] zu entnehmen, die entsprechenden Experimente wurden dort ebenfalls mit Zellen der CHO-K1 Zelllinie durchgeführt. Dies verdeutlicht, dass die Bestimmung der Konstanten von mehreren Parametern abhängt, wie dem genetischen Kontext, der Proteinumgebung oder auch der Durchführung der Bindungsstudien, und dass diese experimentell bestimmten Werte keine universellen Konstanten darstellen.

3.1.3 Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten verschiedener Xanthinderivate

In den Kompetitionsassays wurde die Verdrängung des [^3H]DPCPX von den Bindungsstellen des Adenosin A_1 -Rezeptors durch verschiedene, im Haus synthetisierte Xanthinderivate untersucht und hierüber die K_i -Werte dieser Substanzen zum besagten Rezeptor-Subtyp bestimmt. Je nach Konzentration der Testsubstanz wird der Radioligand unterschiedlich stark verdrängt und man erhält über eine Kurvenanpassung die gewünschte Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Inhibitors, welche nach Cheng und Prusoff [73] über das Programm GraphPad Prism der Firma GraphPad Software bestimmt werden kann.

Abbildung 15 zeigt beispielhaft die Kompetitionskurve der Verdrängung von [^3H]DPCPX mit CPFPX. Es wurde ein K_i -Wert von 15,1 nM für dieses Xanthinderivat erhalten.

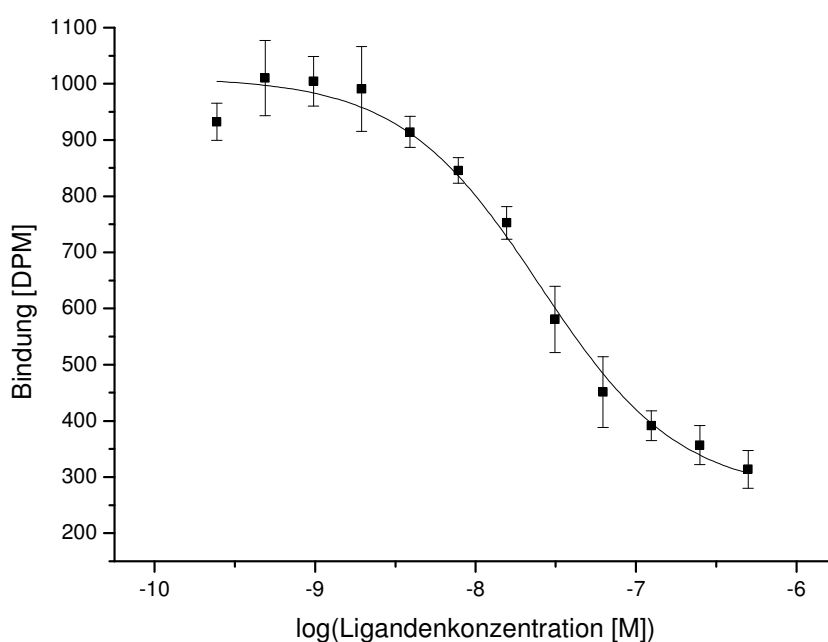


Abbildung 15: Kompetitionskurve der Verdrängung von [^3H]DPCPX mit CPFPX.

Die Strukturen sowie die jeweiligen Bindungsdissoziationskonstanten, molaren Massen und logP-Werte aller untersuchten Verbindungen sind der Abbildung 16 zu entnehmen. Es konnte gezeigt werden, dass der K_i -Wert im Rahmen der getesteten Verbindungen keine Abhängigkeit vom logP-Wert oder von der molaren Masse der Testsubstanzen besitzt.

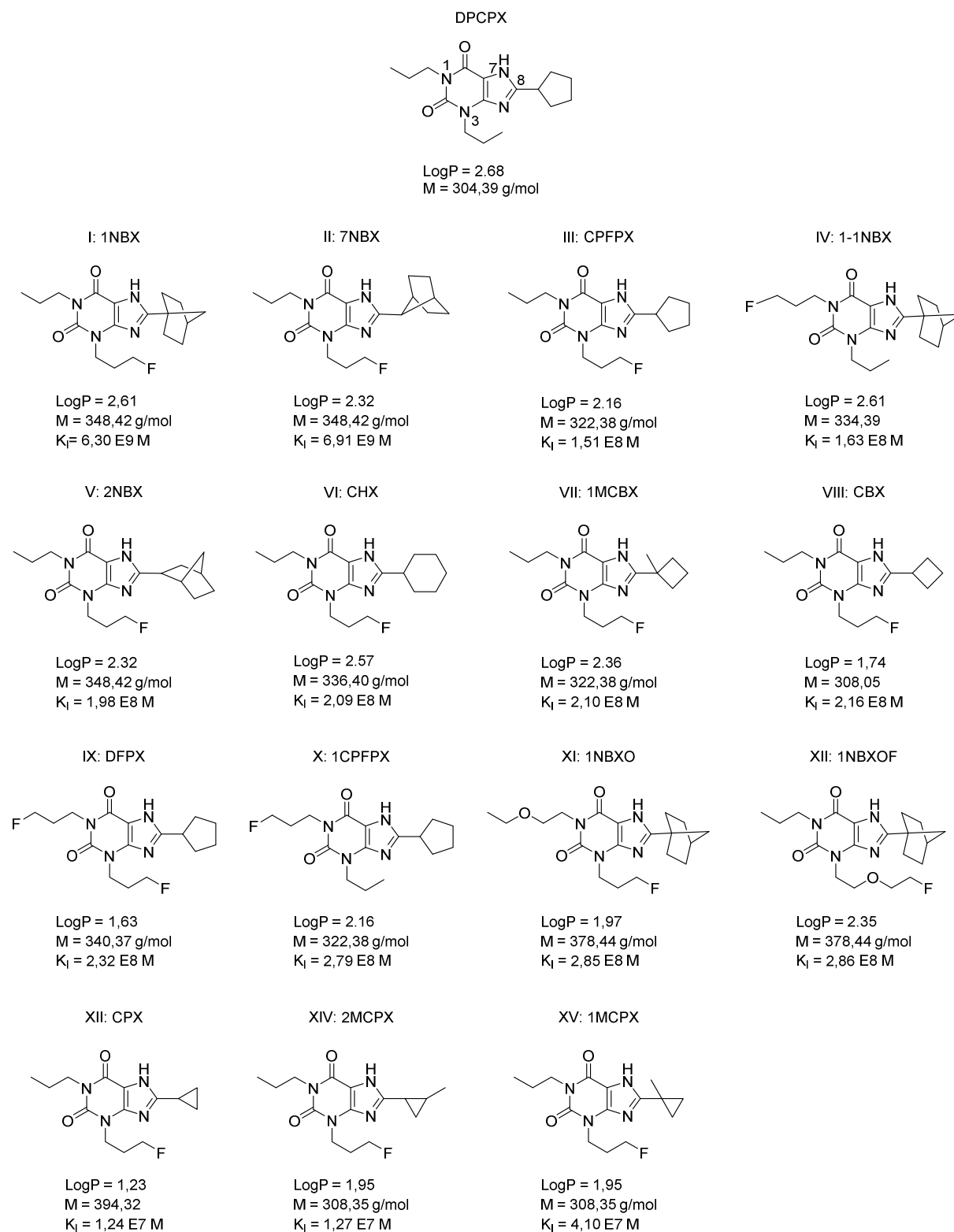


Abbildung 16: Gemessene K_f -Werte, über *ChemBioDraw* bestimmte LogP-Werte sowie molekulare Massen früherer im Haus dargestellter Xanthinderivate.

Vielmehr ist der Einfluss der chemischen Struktur festzustellen: Befindet sich eine Oxy-Gruppe in einer der beiden Alkylketten in 1- oder 3-Position, so vergrößert sich der K_I -Wert stark um mehr als eine Größenordnung. Fluorierte Alkylketten in der 3-Position führen zu kleineren Gleichgewichtsdissoziationskonstanten als solche in der 1-Position. Des Weiteren bewirken kleinere Cycloalkane in der 8-Position eine geringere Affinität zum A_1 -Rezeptor als größere, wie insbesondere die verbrückten Norbornansubstituenten. Methylsubstituenten am Cycloalkan in 8-Position beeinflussen die Dissoziationskonstante ebenfalls. Auffällig ist, dass diese Substituenten die Gleichgewichtsdissoziationskonstante bei Verbindungen mit einem Cyclopropylrest in der 8-Position vergrößern, während Substanzen mit Cyclobutylresten in derselben Position affiner zum besagten Rezeptor werden.

Den geringsten K_I -Wert und damit verbunden die höchste Affinität der hier untersuchten Xanthinderivate besitzen 1NBX und 7NBX mit Werten von 6,30 bzw. 6,91 nM. Die Dissoziationskonstante des bereits in radiofluorierter Form für PET-Studien verwendeten Adenosinrezeptorliganden CPFPX [65] beträgt in der vorliegenden Messreihe 15,1 nM. Dieser Wert liegt etwa um den Faktor zwölf höher als der aus der Literatur bekannten K_D -Wert von 1,26 nM [62], welcher ebenfalls mit den Adenosin A_1 -Rezeptor exprimierenden Zellen der CHO-K1 Zelllinie bestimmt wurde. Wie oben (vgl. 3.1.2) schon dargelegt wurde, hängt die Dissoziationskonstante jedoch von verschiedenen Parametern ab und ist daher nicht vergleichbar. Hier ist insbesondere das Ausmaß der unspezifischen Bindung des nicht radioaktiv markierten Liganden an den Membranen, welche bei verschiedenen Zelllinien und Experimenten variieren kann, entscheidend. Durch diese sind die freien Ligandenkonzentrationen im Assay stets kleiner als die berechneten Konzentrationen.

Das Ziel dieser Kompetitionsversuche war ein Vergleich der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der Xanthinderivate zu demjenigen des CPFPX. Zusätzlich sollten Aussagen zum Zusammenhang zwischen den Strukturmerkmalen der Verbindungen und der Dissoziationskonstanten erhalten werden. Dies konnte über die durchgeführten Untersuchungen erreicht werden, so dass es unter anderen auf dieser Grundlage gelang, neue möglichst affine Verbindungen als Adenosin A_1 -Rezeptorliganden zu konzipieren.

3.2 Funktionelle Assays

Zur Validierung des cAMP-Glo™ Assays für die Bestimmung der mittleren effektiven Konzentrationen (EC_{50} -Werte) der bereits bei den Kompetitionsassays verwendeten Xanthinderivate wurden zunächst Studien mit einer PC-12-Zelllinie, welche den Adenosin A_{2A} -

Rezeptor exprimiert, durchgeführt. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um Zellen eines Tumors der Nebenniere von embryonalen Ratten. Als Testsubstanz wurde der A_{2A} -spezifische Agonist CGS 21860 verwendet. Der Vorteil dieses Systems besteht darin, dass die Adenylylcyclase (AC) aktiviert und so die cAMP-Produktion in den Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration des Agonisten vermehrt wird. Dadurch ist eine größere Dynamik in den Lumineszenzen bei den Versuchen zu erwarten, als bei Versuchen mit A_1 -Rezeptoren, bei denen die AC inhibiert und die in den Zellen vorhandene, ohnehin geringe cAMP-Konzentration durch Zugabe eines Agonisten vermindert wird. Zudem wird für die Versuche mit Antagonisten als Testsubstanz stets ein Agonist benötigt, so dass die Untersuchung dieses Systems sinnvoll erscheint. Es wurde zunächst die für die funktionellen Assays notwendige Zellzahl untersucht, um eine möglichst große Dynamik zu erhalten. Es stellte sich heraus, dass hierfür etwa 25.000 Zellen pro Well ausreichend sind. Allerdings konnten mit diesen Tests keine zufriedenstellenden Kurven zur Bestimmung eines EC_{50} -Werts erhalten werden.

Daher wurden weitere Versuche mit der im Haus stabil transfizierten CHOB#19-Zelllinie durchgeführt, welche den humanen Adenosin A_{2A} -Rezeptor exprimiert. Es stellte sich heraus, dass eine Startkonzentration des CGS 21860 von 250 μ M gut geeignet ist, um eine vollständige Kurve der Abhängigkeit der cAMP-Produktion von der Ligandenkonzentration zu erhalten. Es wurde ein Konzentrationsbereich von 0,03 nmol/L bis 250 μ mol/L betrachtet, und die mittlere effektive Konzentration konnte mit $EC_{50} = 28,7 \mu$ M bestimmt werden (vgl. Abbildung 17).

Vergleiche mit der Literatur sind hier nicht sinnvoll, da zu viele Parameter, unter anderem die Anzahl der Zellen, die mittlere effektive Konzentration beeinflussen. Unter Einsatz von etwa 25.000 Zellen pro Well wurde eine gute Dynamik erhalten. Höhere Zellzahlen führen zu einem sehr starken Anstieg zwischen der maximalen Lumineszenz bei geringer cAMP-Produktion für niedrige Ligandenkonzentrationen und der minimalen Lumineszenz bei maximaler cAMP-Produktion bei hohen Ligandenkonzentrationen. Der Zwischenbereich lässt sich dabei nicht gut detektieren, so dass der EC_{50} -Wert nur annähernd bestimmt werden kann.

Zur Übertragung der Ergebnisse auf Zellen, die den Adenosin A_1 -Rezeptor exprimieren, wurden Versuche mit Forskolin durchgeführt, welches das Enzym Adenylylcyclase aktiviert [79] und daher nicht nur A_{2A} -spezifisch ist. Es konnten allerdings keine vollständigen Kurven aufgenommen werden, da die Verbindung in höheren Konzentrationen eine geringe Löslichkeit im Puffer besitzt und ein erhöhter Zusatz von Dimethylsulfoxid die Zellen

schädigen würde. Daher wurde für weitere Versuche auf das hydrophilere Forskolinderivat NKH 477 zurückgegriffen.

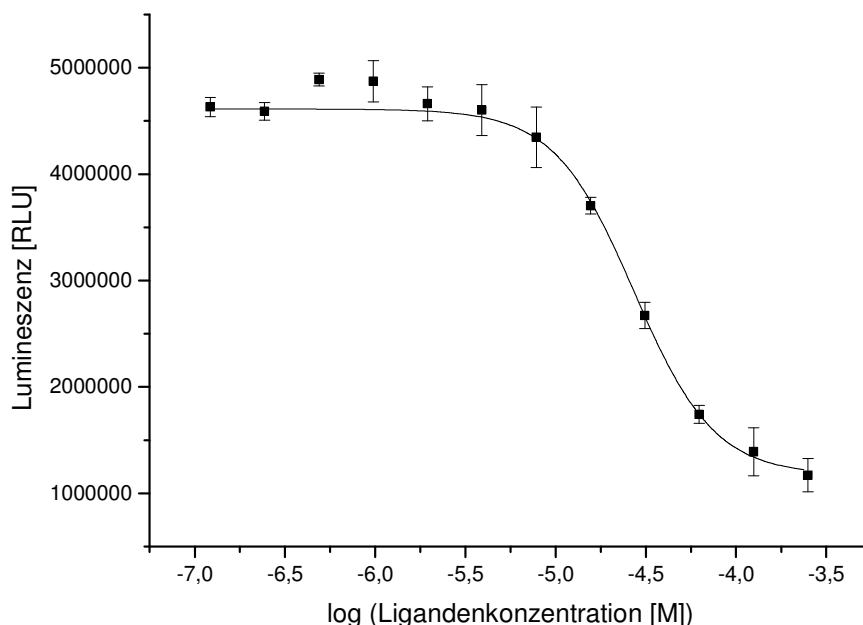


Abbildung 17: Lumineszenz in Abhängigkeit von der Konzentration des CGS 21860 an CHOB#19-Zellen.

Auch hierbei erhält man mit einer Zellzahl von etwa 25.000 eine gute Dynamik. Mit Ligandenkonzentrationen von 254 nmol/L bis 520 µmol/l wurde eine aussagekräftige Kurve erhalten, und die mittlere effektive Konzentration wurde zu $EC_{50} = 22,9 \mu M$ bestimmt (vgl. Abbildung 18). Eine Erhöhung der Inkubationszeit von 60 auf 100 Minuten bewirkte keinen Unterschied in den Ergebnissen.

Die Versuche mit NKH 477 als Testsubstanz ließen sich problemlos auf die den Adenosin A_1 -Rezeptor enthaltene CHO#38b-Zelllinie, welche bereits für die Bindungsstudien verwendet wurden, übertragen (vgl. Abbildung 19). So wurde eine mittlere effektive Konzentration von $EC_{50} = 46,2 \mu M$ für diese Testsubstanz bestimmt.

Zur Bestimmung des EC_{50} -Werts von DPCPX als selektiven A_1 -Rezeptorliganden an den CHO#38-Zellen wurden die Zellen zunächst mit NKH 477 in konstanter Konzentration als Agonist inkubiert, um einen Effekt bei der cAMP-Produktion hervorzurufen. Anschließend wurde mit verschiedenen Konzentrationen von DPCPX inkubiert und der Assay wie beschrieben durchgeführt, um die Konzentrationsabhängigkeit des Lumineszenzsignals zu untersuchen.

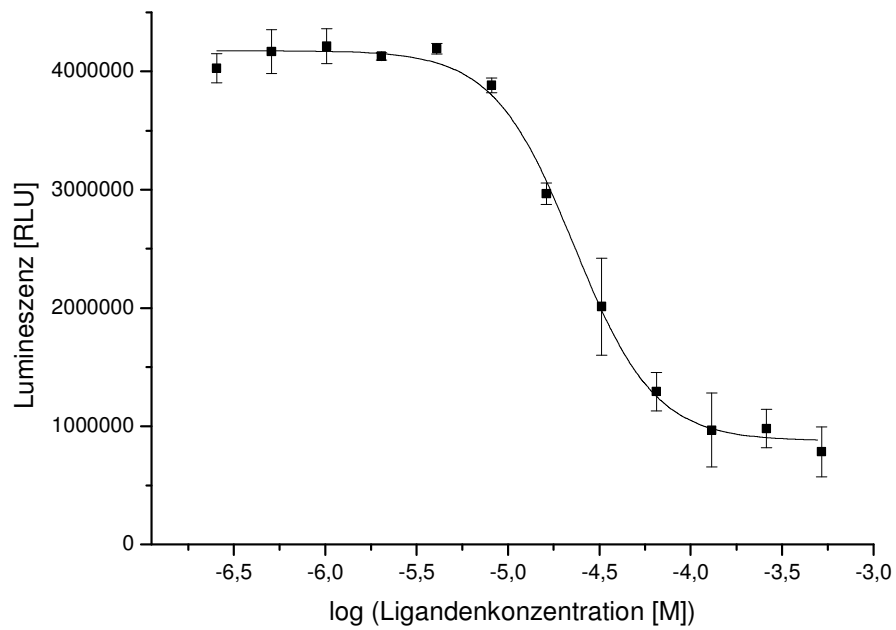


Abbildung 18: Bestimmung des EC_{50} -Werts von NKH 477 an Zellen der CHO#19-Zelllinie.

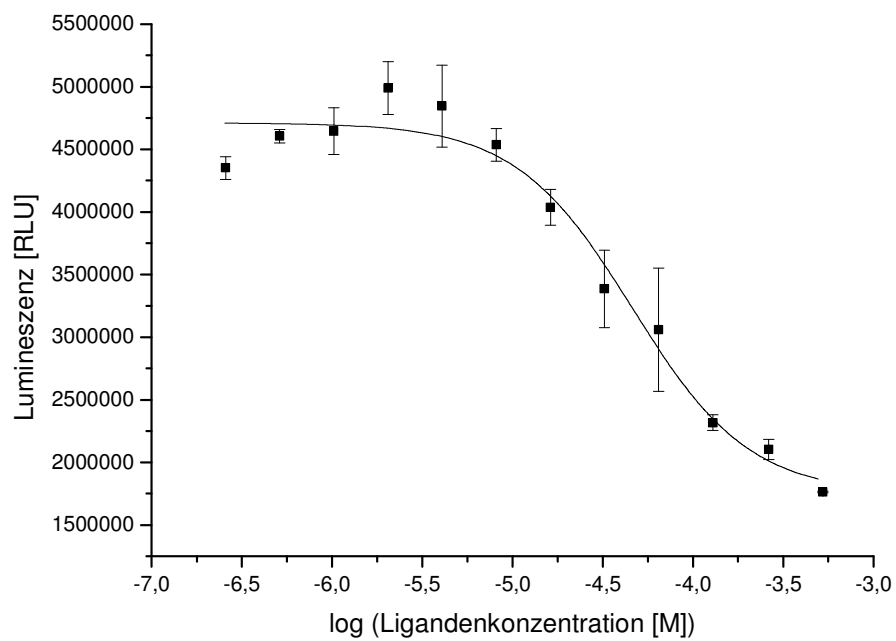


Abbildung 19: Bestimmung des EC_{50} -Werts von NKH 477 an Zellen der CHO#38b-Zelllinie.

Es wurde jedoch auch nach Änderungen der Inkubationszeit oder der Reihenfolge der Zugabe der beiden Liganden kein aussagekräftiger Effekt auf die Lumineszenz festgestellt. Ein Grund hierfür könnte der verwendete Agonist selbst sein. Da NKH 477 als Forskolin-derivat ebenfalls die AC aktiviert, ist vermutlich der Anteil der A_1 -Rezeptoren, welche durch das DPCPX blockiert werden, im Vergleich zu allen anderen aktivierten Enzymen zu gering. Dadurch kann kein Effekt des Antagonisten beobachtet werden. Hierfür spricht auch die Untersuchung von NKH 477 an der CHO WT-Zelllinie.

Die aufgenommene Kurve (vgl. Abbildung 20) besitzt ebenfalls eine große Dynamik und ist vergleichbar mit derjenigen, welche bei Verwendung der CHO#38b-Zelllinie erhalten wurde. Dies spricht für einen hohen Anteil des Liganden an der cAMP-Produktion.

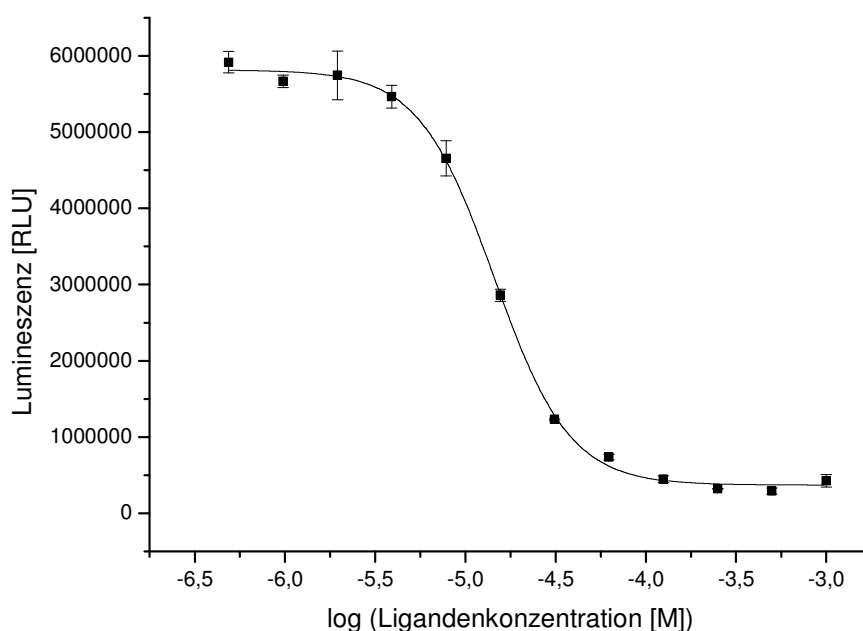


Abbildung 20: Effekt von NKH 477 auf die cAMP-Produktion in CHO WT-Zellen.

Daher wurde zunächst die Abhängigkeit der cAMP-Produktion von der Konzentration des A_1 -, A_{2A} - und A_3 -spezifischen Agonisten NECA an der Wildtyp-Zelllinie untersucht. Wie erwartet, ist bei diesen Versuchen die Dynamik des Assays deutlich geringer (vgl. Abbildung 21). Zudem steigt die Lumineszenz mit größerer Ligandenkonzentration an, anstatt wie zuvor abzufallen. Dies spricht dafür, dass die Änderung in der cAMP-Menge durch die Aktivierung der A_1 -Rezeptoren in den Zellen hervorgerufen wird, da mit höherer Ligandkonzentration die AC gehemmt und so weniger cAMP gebildet wird.

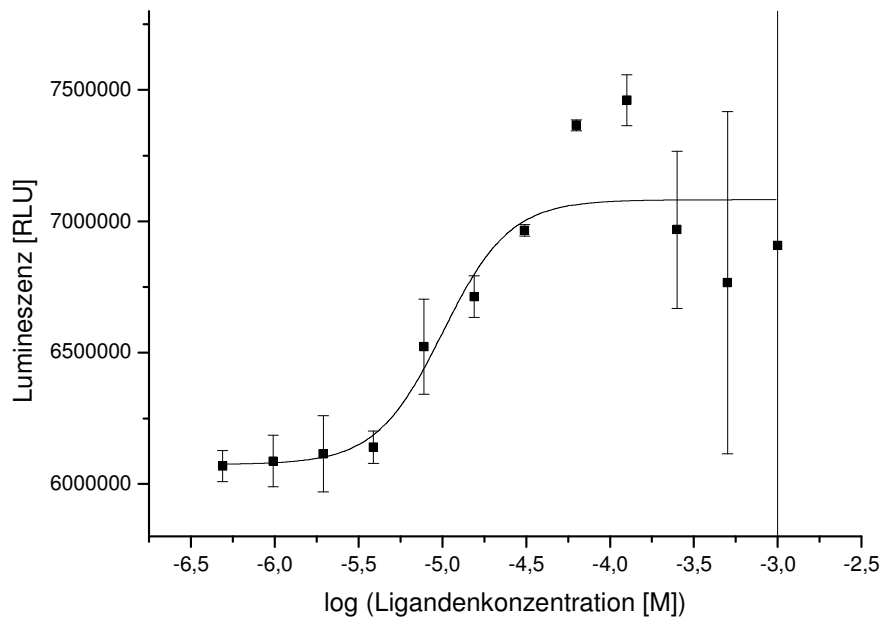


Abbildung 21: Effekt von NECA auf die cAMP-Produktion in CHO WT-Zellen.

Da Versuche mit Zellen der CHO#38b-Zelllinie und NECA als Liganden ähnliche Kurvenverläufe mit einem unerwartet hohen EC_{50} -Wert von $85,1 \mu\text{M}$ zeigen, wurde der Konzentrationsbereich der Liganden zur Untersuchung der cAMP-Produktion ausgeweitet (vgl. Abbildung 22). Auch dabei werden hohe EC_{50} -Werte erhalten, während es bei kleineren Ligandenkonzentrationen ab $1 \mu\text{M}$ zu Schwankungen in den Lumineszenzsignalen kommt. Es ist zu vermuten, dass die eigentliche effektive Konzentration innerhalb dieses Bereichs liegt, die Hemmung der AC und die damit verbundene Änderung der geringen cAMP-Menge jedoch nicht groß genug für eine ausreichende Dynamik des Assays ist. Die Verringerung der cAMP-Konzentration und damit die Erhöhung der Lumineszenz ab NECA-Konzentrationen von $1 \mu\text{mol/L}$ könnte auch auf andere Vorgänge in den Zellen zurückzuführen sein, welche bisher nicht untersucht wurden.

Zur Steigerung der Dynamik des Assays wurde durch Zugabe von Natriumbutyrate zu den Zellen versucht, die Rezeptorexpressionsrate anzuregen [80]. Dies führte erneut zu keinen aussagekräftigeren Ergebnissen. Daher wurden einige Studien durchgeführt, um die prinzipielle Nutzbarkeit dieses Assays für das Adenosinrezeptorsystem zu untersuchen. Hierbei wurden die Lumineszenzkurven in Abhängigkeit von den Konzentrationen vier verschiedener Liganden an Zellen der CHO WT-, CHO T3#3- (A_{2A}) sowie CHO#38b-Zelllinie (A_1) untersucht. Als Agonisten dienen das unspezifische Forskolinderivat NKH 477, das Adenosin-

spezifische NECA, das A_{2A} -spezifische CGS 21860 sowie das A_1 -spezifische CPA. Die entsprechenden Kurven zu diesen Versuchen sind im Anhang (Kap. 7) dargestellt.

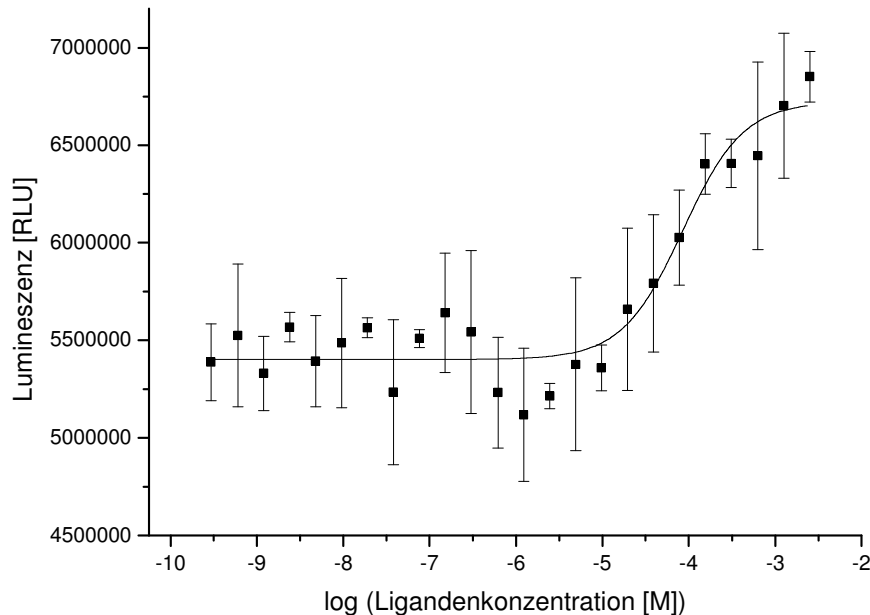


Abbildung 22: cAMP-Glo Assay an CHO#38b-Zellen mit NECA als Testsubstanz.

Mit NKH 477 als unspezifischem Agonist müsste die cAMP-Produktion bei allen untersuchten Zelllinien mit zunehmender Ligandenkonzentration ansteigen und dementsprechend die Lumineszenz sinken, da unabhängig vom G-Protein gekoppeltem Rezeptortyp die AC aktiviert und cAMP produziert wird. Dies ist bei allen Experimenten der Fall (vgl. Abbildungen I-III, Anhang), so dass angenommen werden kann, dass die erhaltenen Kurven Aussagen über die cAMP-Produktion in den Zellen prinzipiell möglich machen.

Bei Verwendung von NECA als spezifischem Adenosin-Liganden wurde erwartet, dass bei den CHO WT-Zellen kein oder nur ein geringer Effekt bei Änderung der Ligandenkonzentration auftritt, da diese keinen Adenosin-Rezeptor exprimieren. Die Lumineszenz bei Versuchen mit der CHO T3#3-Zelllinie, welche den Adenosin A_{2A} -Rezeptor exprimiert, sollte mit steigender Ligandenkonzentration aufgrund der zunehmenden cAMP-Produktion sinken, während diejenige der CHO#38b-Zelllinie (A_1 -Rezeptor) größer werden sollte, da hier die AC gehemmt und so weniger cAMP gebildet wird. Die Versuche zeigen jedoch neben einem leichten Anstieg der Lumineszenz bei Verwendung der Wildtyp-Zellen einen ähnlichen Kurvenverlauf bei den CHO T3#3- und den CHO#38b-Zelllinien, bei denen die Lumineszenzen bei niedrigen Ligandenkonzentrationen leicht schwanken und bei höheren Konzen-

trationen ansteigen. Es wird also in beiden Fällen die Produktion des cAMP in den Zellen gehemmt (vgl. Abbildungen IV-VI, Anhang).

Die Verbindung CGS 21860 sollte als Adenosin A_{2A}-spezifischer Ligand keinen Effekt auf die cAMP-Produktion bei den Wildtyp- sowie den CHO#38b-Zellen hervorrufen. Steigende Konzentrationen dieses Liganden sollten jedoch bei Zellen der CHO T3#3-Zelllinie zu erhöhter cAMP-Produktion und daher zu geringerer Lumineszenz führen. Dieser Kurvenverlauf ist allerdings nicht nur dort, sondern auch bei Zellen der CHO#38b-Zelllinie zu erkennen (vgl. Abbildungen VII-IX), während die Lumineszenz bei Verwendung der Wildtypzellen weitgehend konstant bleibt.

CPA sollte als Adenosin A₁-spezifischer Ligand ebenfalls keinen Effekt auf die cAMP-Produktion bei den Wildtyp-Zellen induzieren. Ebenso sollte bei den CHO T3#3-Zellen kein Effekt zu sehen sein. Die Lumineszenz bei Verwendung der CHO#38b-Zelllinie sollte gemäß sinkender cAMP-Menge mit steigender Ligandenkonzentration ansteigen. Die Ergebnisse der Experimente weisen allerdings bei keiner der verwendeten Zelllinien einen aussagekräftigen Effekt auf, wie er theoretisch zu erwarten gewesen wäre (vgl. Abbildungen X-XII).

Der Schluss liegt nahe, dass der cAMP-Glo™ Assay nicht zur Untersuchung der Funktionalitäten dieser Adenosinrezeptoren an den verwendeten Zelllinien geeignet ist. Dies könnte unter anderem daran liegen, dass die Adenosinrezeptoren bei den Zellen dieser Zelllinien vermehrt im Zellinneren zu finden sind und daher für die Adenosin-spezifischen Liganden nicht erreichbar sind. Des Weiteren ist es möglich, dass in den Zellen zwar die entsprechenden Adenosin-Rezeptoren exprimiert sind, die biologisch erforderlichen Signalkaskaden jedoch nicht vollständig ausgebildet werden bzw. die zelleigenen nicht mit den humanen Rezeptoren in Interaktion treten können, so dass keine AC stimuliert bzw. gehemmt wird und sich daher die Menge des cAMPs nicht verändert, wodurch die Durchführung der funktionellen Studien in diesem System nicht möglich ist.

3.3 Auswahl von Xanthinderivaten als neue, potentiell affine Adenosin A₁-Rezeptorliganden

3.3.1 Publierte Struktur-Affinitäts-Beziehungen

Es wurden bereits viele Studien über die Änderungen der Affinitäten von Antagonisten zum A₁- bzw. A₂-Adenosinrezeptor in Abhängigkeit von verschiedenen Substituenten in 1-, 3-, 7- oder 8-Position (vgl. Abbildung 23) veröffentlicht.

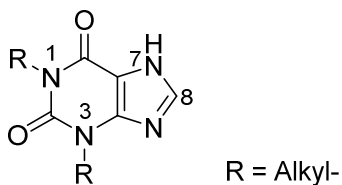


Abbildung 23: Molekülstruktur 1,3,-dialkylsubstituierter Xanthinderivate.

Durch Erickson *et al.* [81] wurde gefunden, dass Verbindungen mit Phenylsubstituenten in 8-Position neben ihrer hohen Affinität zum A₁-Rezeptor auch eine vergleichsweise gute Affinität zum A₂-Rezeptor besitzen. Dadurch ist das A₂/A₁-Verhältnis mit 15 - 79 sehr klein, so dass dieser Substituent nicht zur Darstellung selektiver Adenosin A₁-Antagonisten in Frage kommt. Des Weiteren besitzen Xanthinderivate mit einer Methylgruppe in der 3-Position eine relativ hohe Affinität zum A₂-Rezeptor, so dass auf diese bei der Synthese neuer Derivate verzichtet werden sollte [81].

Die Arbeit von Shimada *et al.* [82] befasst sich ebenfalls mit den Auswirkungen verschiedener Substituenten an Xanthinderivaten auf die Affinität zum A₁-Rezeptor. Es wurde gefunden, dass Alkylsubstituenten in der 8-Position eine im Vergleich zum DPCPX 6- bis 16-fache Erhöhung des K_i-Werts bewirken. Da diese jedoch ebenfalls eine Affinität zum A₂-Rezeptor aufweisen, besitzen sie ein kleines A₂/A₁-Verhältnis mit 7,6 bis 48. Dies lässt darauf schließen, dass Alkylreste in der 8-Position nicht für die Darstellung von Adenosin A₁-Antagonisten geeignet sind und hier auf Cycloalkylgruppen zurückgegriffen werden sollte. Ebenfalls stellte sich heraus, dass Substituenten mit einer Kettenlänge von drei nicht verknüpften Kohlenstoffatomen in der 1- und 3-Position der Xanthinderivate die niedrigsten K_i-Werte am A₁-Rezeptor bewirken, während kürzere, längere oder verzweigte Substituenten zu höheren Dissoziationskonstanten führen [82]. Die höhere Affinität von 1,3-dipropyl-substituierten Xanthinderivate zu A₁-Rezeptoren im Vergleich zu methyl- oder ethylsubstituierten Derivaten wird durch Arbeiten von Bruns *et al.* untermauert [83].

Die Auswirkungen von Arylsubstituenten in der 8-Position wurden ebenfalls von Daly *et al.* [84] sowie Jacobson *et al.* [85] untersucht. Es zeigt sich, dass Phenylreste an dieser Stelle zu höheren K_i-Werten für den Adenosin A₁-Rezeptor führen als DPCPX. Andere Funktionalitäten wie Hydroxy-, Ether-, Carbonyl-, Amino-, Schwefel- oder Halogensubstituenten am Aromaten bewirkten eine Verschlechterung der Affinität und eine schlechtere A₂/A₁-Spezifität, so dass diese ebenfalls nicht zur Darstellung neuer affiner Antagonisten geeignet sind [84-86]. Weiterhin führen Halogensubstituenten am Cyclopentylring des DPCPX zu geringen, sowie ungesättigte Bindungen sogar zu sehr geringen Affinitäten zum Adenosin A₁-Rezeptor [85].

Suzuki *et al.* [87] fanden heraus, dass zusätzliche Substituenten (Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Carboxymehtyl-) in der 7-Position des DPCPX eine deutliche Verschlechterung der Affinität zum Adenosin A₁-Rezeptor mit K_i-Werten von 1600 (Ethyl-) bis 13000 (Propyl-) bewirken und daher keine Alternativen zur Entwicklung von Antagonisten mit höherer Affinität darstellen. Auch wurde der Einsatz von Bicyclen wie Norbornylderivate in der 8-Position untersucht. Diese besitzen zwar eine niedrige Gleichgewichtsdissoziationskonstante zum A₁-Rezeptor, haben aber durch ihre Affinität zum A₂-Rezeptor eine schlechte Selektivität [87].

Zusammenfassend ist zu sagen, dass Arylgruppen in der 8-Position zur Darstellung möglichst affiner Adenosin A₁-Rezeptorliganden aufgrund ihrer Affinität zum A₂-Rezeptor nicht geeignet sind. Ebenso sollte auf den Einsatz von Methyl- und Ethylgruppen in der 1- und 3-Position verzichtet werden, da sie den K_i-Wert zum A₁-Rezeptor erhöhen, und es im Fall der Methylgruppe in 3-Position zusätzlich zu einer erhöhten Affinität zum A₂-Rezeptor kommt. Alkylgruppen stellen keine Alternative zur Substitution in der 8-Position dar, da dies zu geringeren Affinitäten führt. Auch sollten hier keine Bicyclen eingebracht werden, da solche Derivate ebenfalls eine erhöhte Affinität zum A₂-Rezeptor besitzen. Eine Substitution an der 7-Position in Xanthinen führt generell zu sehr schlechten Affinitäten und ist daher grundsätzlich zu vermeiden.

3.3.2 Vorhergegangene Metabolismusstudien

Durch vorab im Haus durchgeführte *in vitro* Metabolismusstudien wurde der Abbau der oben erwähnten Xanthinderivate (vgl. Abbildung 16, Kap. 3.1.3) mit humanen Lebermikrosomen untersucht. Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass Xanthinderivate mit einem Norbornylsubstituenten in R₈-Position, welche den günstigsten K_i-Wert besitzen (vgl. Kapitel 3.1.3), sehr schnell metabolisiert werden und so die biologische Halbwertszeit dieser Verbindungen im Körper gering ist (vgl. Tabelle 3). 8-Cyclopropylxanthinderivate werden mit 37,3 - 41,1 fmol/min pro Ansatz in diesen Versuchen zwar etwas langsamer abgebaut, dennoch ist hier der Metabolismus noch sehr schnell. Dies ist auch an der biologischen Halbwertszeit des [¹⁸F]CPFPX im menschlichen Blutplasma zu erkennen, welche mit etwa 10 Minuten sehr gering ist [70]. Das MCBX besitzt mit einem Cyclobutylrest in der 8-Position eine im Vergleich doppelt so große Stabilität; es wird mit einer Rate von 20,0 fmol/min pro Ansatz metabolisiert. Dies zeigt, dass die metabolische Stabilität der Xanthinderivate umso größer ist, je kleiner die Volumina der Cycloalkylsubstituenten in Position 8 sind. Vermutlich werden die Xanthine zuerst an dieser Gruppe durch die Lebermikrosomen zu polareren

Derivaten umgesetzt, wie dies auch beim CPFPX der Fall ist, für das eine Metabolisierung zum 3-(3-Fluorpropyl)-8-(3-oxocyclopent-1-enyl)-1-propylxanthin nachgewiesen wurde [88].

Eine Ausnahme bilden Verbindungen mit einem Cyclopropylrest in 8-Position. Diese werden etwas schneller metabolisiert als ihre Cyclobutylhomologe. Dies könnte an der größeren Ringspannung dieser Reste liegen (Cyclopropan: 36,3 kJ/mol pro CH₂-Gruppe [89]; Cyclobutan: 26,4 kJ/mol pro CH₂-Gruppe [90]), so dass durch die Lebermikrosomen möglicherweise eine Ringöffnung stattfindet.

Tabelle 3: Abbau verschiedener Xanthinderivate durch Lebermikrosomen.

Die entsprechenden Strukturen sind in Abbildung 16, Kap. 3.1.3 zu finden.

Verbindung	Abbau [fmol/min pro Ansatz]	Verbindung	Abbau [fmol/min pro Ansatz]
1MCBX (VII)	20,0	1NBXOF (XII)	43,8
CBX (VIII))	23,3	CPX (XIII)	48,1
1MCPX (XV)	31,3	1-1NBX (IV)	71,4
2MCPX (XIV)	36,8	1NBX (I)	85,1
DFPX (IX)	37,3	2NBX (V)	91,0
CPFPX (III))	40,6	7NBX (II)	96,0
1-CPFPX (X)	41,1		

Die Position des Fluoralkylsubstituenten (*N*-1- oder *N*-3-) scheint für den Metabolismus nicht entscheidend zu sein, da das CPFPX langsamer abgebaut wird als 1-CPFPX, 1NBX jedoch schneller als 1-1NBX metabolisiert wird. Zusätzliche Methylsubstituenten am Cycloalkylrest bewirken einen langsameren Metabolismus (vgl. CPX, 1MCPX, 2MCPX, Tabelle 3). Vermutlich schützen sie den Cycloalkylrest sterisch vor dem Angriff metabolisierender Substrate.

3.3.3 Konzipierte Xanthinderivate als mögliche Adenosin A₁-Rezeptorliganden

Die Auswahl neuer Xanthinderivate als möglichst affine und selektive Adenosin A₁-Rezeptorliganden basiert auf den Ergebnissen der bereits durchgeführten Bindungsstudien mit den oben genannten Xanthinderivaten (vgl. Kap. 3.1.3). Ebenso stützt sie sich auf die durchgeführten Metabolismusstudien, Erfahrungswerte aus der Literatur sowie die logP-Werte der neu konzipierten Verbindungen.

Über die durchgeführten Kompetitionsassays wurde gefunden, dass in der 1- und 3-Position Sauerstoffbrücken enthaltende Substituenten zu vermeiden sind. Zudem sollte sich der fluorierte Substituent in der 3-Position befinden und der Cycloalkylring in der 8-Position nicht weniger als vier Kohlenstoffatome besitzen, wobei eine weitere Alkylierung mit Methylgruppen möglich ist.

Aus den Metabolismusstudien resultiert, dass der Cycloalkylring in 8-Position nicht größer als vier Kohlenstoffatome sein sollte, da dies zu einem schnellen Abbau führt. Zusätzliche Methylsubstituenten führen zu einem langsameren Metabolismus.

Entsprechend der vorherigen auf der Literatur basierenden Diskussion sind Arylreste, Bicyclen und Alkylgruppen in der 8-Position zu vermeiden. Zudem sollte die 7-Position nicht substituiert werden und keine Methyl- oder Ethylgruppe in der 1- oder 3-Position vorhanden sein.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden neue Xanthinderivate als möglicherweise affine und selektive A₁-Rezeptorliganden konzipiert. In der 8-Position wird hierbei ein (methylsubstituierter) Cyclobutylring eingebaut. Das Fluor wird wie beim CFPX in Form einer Fluorpropylgruppe in die 3-Position eingebracht. Bei der Auswahl der Substituenten in der 1-Position wurden auch die logP_{ow}-Werte verschiedener Xanthinderivate (vgl. Abbildung 24) herangezogen. Der logP_{ow}-Wert spiegelt den Logarithmus des Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten P_{ow} wieder. Dieser dient als Maß für die Lipophilie einer Substanz, da er dessen Konzentrationsverhältnis in einem Oktanol/Wasser-Zweiphasensystem nach Einstellung des Gleichgewichts angibt. Je größer der logP_{ow}-Wert, desto lipophiler ist die Substanz. Hydrophile Verbindungen besitzen einen negativen Verteilungskoeffizienten [91].

Die neuen Xanthinderivate sollten weder zu hydrophil noch zu lipophil sein, um die Blut-Hirnschranke im Gehirn überwinden zu können. Auch dürfen sie nicht zu hydrophil sein, um eine hohe Affinität zum Adenosin A₁-Rezeptor zu ermöglichen [92]. Die logP_{ow}-Werte sollten daher nach Hansch *et al.* idealerweise im Bereich von 1,5 - 2,7 liegen, um die Blut-Hirnschranke gut durchdringen zu können [93]. Zum Vergleich wurden die clogP_{ow}-Werte (computed logP_{ow}, [92]) möglicher Verbindungen über ihre Molekülstruktur mit verschiedenen Programmen (*ChemBioDraw* (CambridgeSoft, Perkin Elmer, Waltham, USA), *MarvinSketch* [94], *Osiris* [95], *Molinspiration* [96]) bestimmt. Hierbei ergeben sich aufgrund unterschiedlicher mathematischer Algorithmen der einzelnen Programme leicht unterschiedliche Ergebnisse, welche in Tabelle 4 zusammengestellt sind.

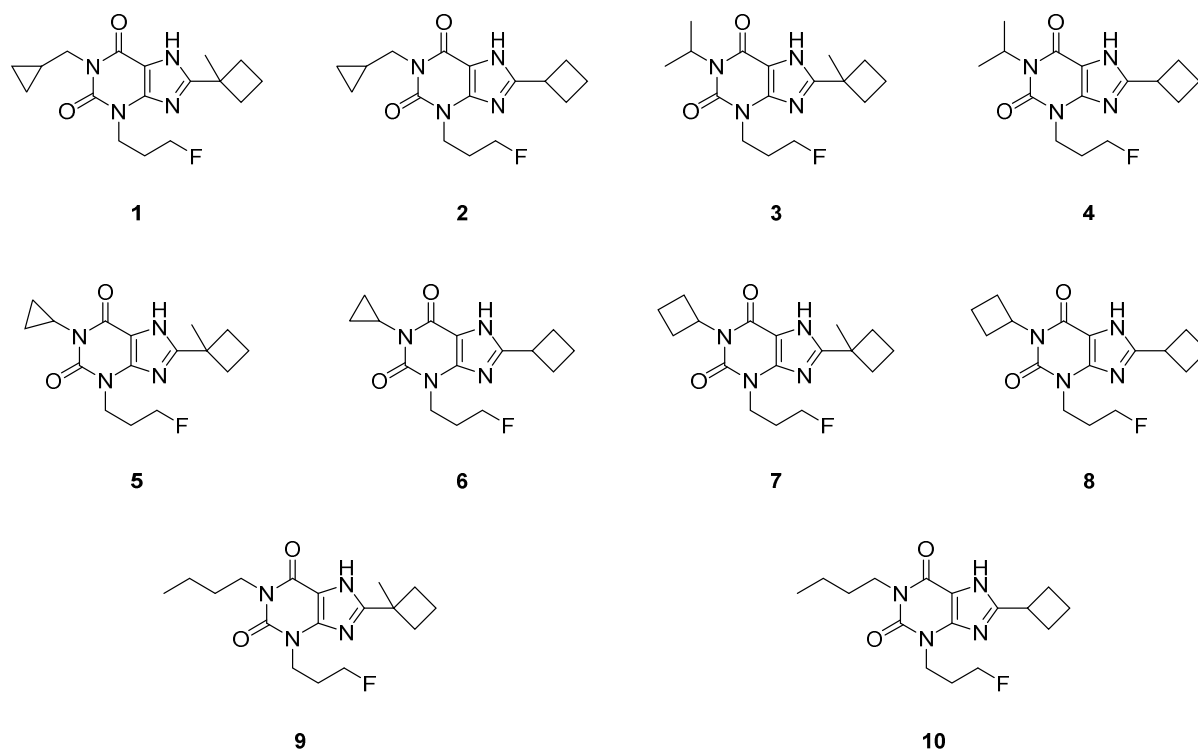


Abbildung 24: Strukturen neu konzipierter Xanthinderivate als mögliche Adenosin A₁-Rezeptorliganden.

Es ist zu erkennen, dass die berechneten clogP_{ow} -Werte teilweise stark voneinander abweichen. Dies ist besonders bei den durch *Molinspiration* bestimmten Verteilungskoeffizienten der Fall. Die Werte, welche mittels *ChemBioDraw* sowie *MarvinSketch* erhalten wurden, stimmen gut miteinander sowie mit dem experimentell bestimmten logP_{ow} -Wert des CPFPX von 2,1 überein [62]. Daher scheinen diese beiden Programme den tatsächlichen Verteilungskoeffizienten sehr nahe zu kommen und werden im Folgenden bevorzugt. Dies zeigt jedoch auch, dass die bestimmten clogP_{ow} -Werte keine Absolutwerte darstellen und die tatsächlichen Koeffizienten nur schwer vorhergesagt werden können. Dennoch können die so erhaltenen Werte als Anhaltspunkte für den relativen Vergleich der Lipophilie verschiedener Verbindungen dienen.

Fast sämtliche oben dargestellten Xanthinderivate (vgl. Abbildung 24) scheinen aufgrund ihrer Lipophilie als mögliche Adenosin A₁-Rezeptorliganden geeignet. Die berechneten clogP_{ow} -Werte liegen in dem optimalen Bereich von 1,5 bis 2,7, daher scheinen die Xanthinderivate in Bezug auf diesen Parameter fast alle gut geeignet, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden [93]. Eine Ausnahme bildet hier die Verbindung **9**, da für diese clogP_{ow} -Werte von über 2,7 berechnet wurden. Diese Verbindung könnte dennoch dazu befähigt sein, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, da hier noch viele weitere Eigenschaften der Verbindung,

wie beispielsweise das Molekulargewicht, die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungsdonatoren oder -akzeptoren, das molekulare Volumen, Ladungen sowie Polaritäten in den Molekülen und damit die Fähigkeit zur Bindung an Proteine, die Eigenschaft zur Durchdringung der Blut-Hirn-Schranke verändern können [97].

Tabelle 4: clogP_{ow}-Werte neuer Xanthinderivate im Vergleich zu denen von DPCPX und CPFPX. Die entsprechenden Strukturen sind Abbildung 24 zu entnehmen.

Verbindung	ChemBioDraw *	MarvinSketch [94]	Osiris [95]	Molinspiration [96]
DPCPX	2,68	2,75	3,09	3,24
CPFPX	2,16	2,13	2,87	3,24
1	2,26	2,13	2,16	2,94
2	1,64	1,58	2,39	2,81
3	2,20	2,12	2,20	2,18
4	1,57	1,58	2,43	2,68
5	1,84	1,81	1,97	2,05
6	1,21	1,27	2,20	2,30
7	2,25	2,26	2,31	1,68
8	1,63	1,71	2,54	2,60
9	2,78	2,67	2,75	1,97
10	2,16	2,13	2,98	3,38

* CambridgeSoft, Perkin Elmer, Waltham, USA.

Zur Darstellung der gewünschten Verbindungen mit der Möglichkeit, dabei die Substituenten in 1- und 3-Position ohne großen Aufwand variieren zu können, ohne einen gesamten Syntheseweg für jede Verbindung durchführen zu müssen, war ein orthogonal geschütztes Xanthinderivat zu synthetisieren. Dieses sollte idealerweise in großen Mengen darstellbar sein und die gewünschten fluorierten Xanthinderivate sowie die Vorläuferverbindungen für mögliche ¹⁸F-Fluorierungen durch wenige einfache chemische Änderungen zugänglich machen.

3.4 Darstellung eines orthogonal geschützten Xanthinderivats und Synthese der Xanthinderivate

Entsprechend der oben erläuterten Überlegungen sollte zur Darstellung der Zielverbindungen zunächst ein orthogonal geschütztes Xanthinderivat dargestellt werden, welches es ermöglicht, die einzelnen Substituenten in 1- und 3-Position in beliebiger Reihenfolge einzuführen (vgl. Abbildung 25). Die eingeführten Schutzgruppen könnten dann selektiv in gewünschter Abfolge entfernt werden, um durch einfache Substitutionen eine Vielzahl an Xanthinderivaten herstellen zu können. Die in der Position 7 befindliche Schutzgruppe sollte unempfindlich gegenüber diesen Reaktionen sein und im späteren Reaktionsverlauf entfernt werden können.

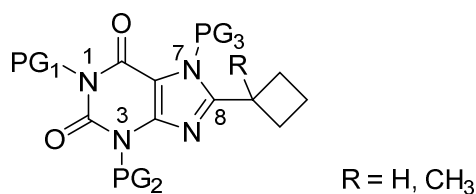


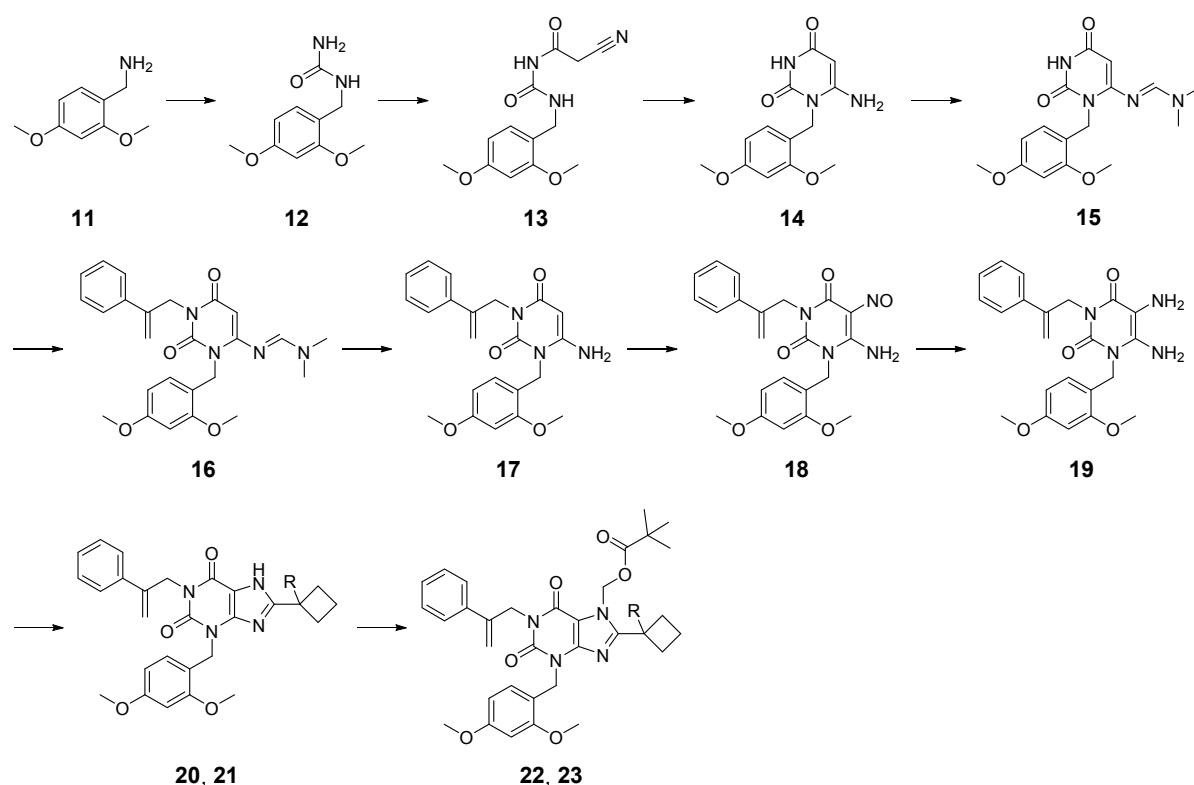
Abbildung 25: Struktur 1,3,7-substituierter Xanthinderivate mit leicht austauschbaren Schutzgruppen (PG).

Das orthogonale Schutzgruppenprinzip beinhaltet hierbei eine selektiv Einführung der Schutzgruppen, welche mit hohen Ausbeuten möglich sein und unter milden Bedingungen erfolgen sollte, um andere funktionelle Gruppen in der geschützten Verbindung nicht anzugreifen. Zudem müssen die Schutzgruppen unter vielen Bedingungen stabil und nur selektiv, in optimaler Weise unter milden Bedingungen, entfernbar sein, beispielsweise durch den Einsatz verdünnter Basen oder Säuren sowie reduktive Bedingungen [98].

Zur Darstellung des orthogonal geschützten Xanthinderivats wurde entschieden, einen Allylphenylsubstituenten in der 1-Position, eine 2,4-Dimethoxybenzylgruppe (DMB) in der 3-Position sowie die Pivaloyloxymethylschutzgruppe (POM) in Position 7 einzuführen. Die DMB-Schutzgruppe ist stabil gegenüber stark alkalischen sowie leicht sauren Bedingungen. Zudem wird sie nicht durch reduktive Hydrierung entfernt. Eine Abspaltung kann hier durch Trifluoressigsäure leicht stattfinden [99]. Allylschutzgruppen eignen sich gut als orthogonale Schutzgruppen, da sie sowohl unter sauren, als auch unter basischen Bedingungen stabil sind. Die Allylphenylschutzgruppe ist hierbei durch den Einsatz von *t*-Butyllithium einfach und selektiv abspaltbar [100]. Die POM-Schutzgruppe wurde bereits bei der Darstellung von Xanthinderivaten erprobt. Sie ist stabil gegenüber Säuren und katalytischer Hydrierung und

lässt sich leicht durch verdünnte wässrige Basen oder methanolische Ammoniaklösung entfernen [88, 101, 102].

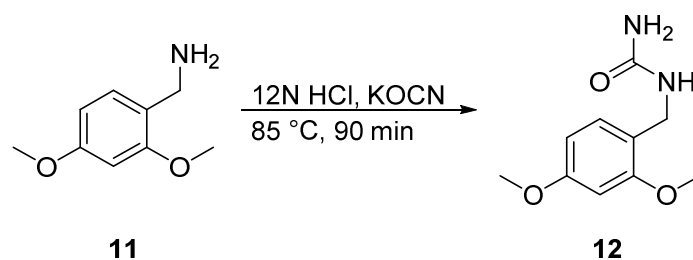
Der entsprechende Syntheseweg ist in Schema 1 gezeigt. Ausgehend von 2,4-Dimethoxybenzylamin (**11**) war mittels Kaliumcyanat der *N*-(2,4-Dimethoxybenzyl)harnstoff (**12**) darzustellen, welcher mit Cyanessigsäure zum *N*-(2,4-Dimethoxybenzyl)-*N*-cyanomethylharnstoff (**13**) umzusetzen war. Nach erfolgter Cyclisierung zum Uracil unter Zugabe von Natriumethanolat war eine *N,N*-Dimethylaminomethylen-Schutzgruppe an der exocyclischen freien Aminfunktion einzuführen, um den Allylphenyl-Substituenten selektiv an *N*-3 einbringen zu können. Die *N,N*-Dimethylaminomethylen-Schutzgruppe war anschließend zu entfernen sowie das Uracil in Position 5 zu nitrosieren und im Anschluss zum Diamin zu reduzieren. Nach Amidierung mit einem geeigneten Carbonsäurederivat sollte nachfolgend der Ringschluss zum Xanthin erfolgen, welches in Position 7 mit der Pivaloyloxymethylfunktion zu schützen war.



R = H (**20**, **22**), CH₃ (**21**, **23**)

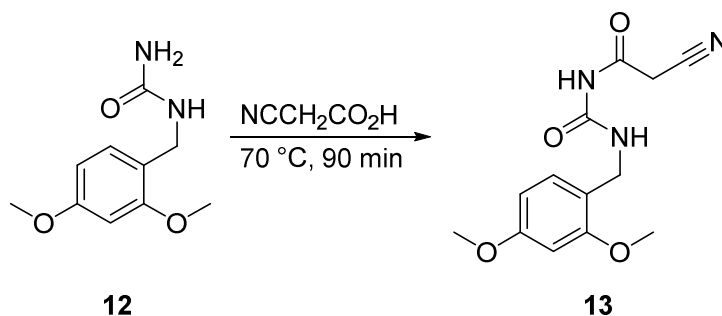
Schema 1: Ausgewählter Syntheseweg zur Darstellung eines orthogonal geschützten Xanthinderivats mit Allylphenyl-, 2,4-Dimethoxybenzyl- sowie 7-Pivaloyloxymethylschutzgruppe.

Die Synthese des *N*-(2,4-Dimethoxybenzyl)harnstoffs (**12**) erfolgte nach Holschbach *et al.* [88] ausgehend von 2,4-Dimethoxybenzylamin (**11**) mit Kaliumcyanat im sauren Medium über einen nukleophilen Angriff des Amins am Kohlenstoffatom des Cyanats (Schema 2). Es konnte ein farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 74 % erhalten werden. Die spektroskopischen Daten (^1H -, ^{13}C -NMR), der Schmelzpunkt von 161 °C und das erhaltene Massenspektrum stimmen mit den Werten aus der Literatur und der Molekülstruktur überein [88].



Schema 2: Synthese des *N*-(2,4-Dimethoxybenzyl)harnstoffs ausgehend von 2,4-Dimethoxybenzylamin.

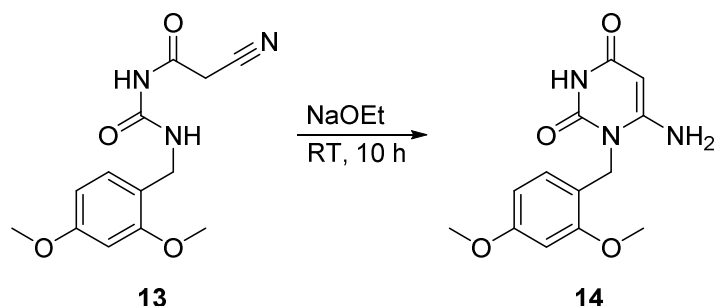
Der *N*-(2,4-Dimethoxybenzyl)-*N'*-cyanomethylharnstoff (**13**) konnte als farbloser Feststoff ebenfalls nach Holschbach *et al.* [88] aus **12** mit Cyanessigsäure in Essigsäureanhydrid in einer Kondensationsreaktion mit einer Ausbeute von 85 % dargestellt werden (Schema 3). Die massenspektrometrischen Daten sowie die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren des erhaltenen β -Ketonitrils stimmen mit denen aus der Literatur überein [88]. Der Schmelzpunkt liegt mit 200 °C etwas unter dem aus der Literatur bekannten Wert von 223 - 224 °C [88], was für eine leichte Verunreinigung des Produktes spricht.



Schema 3: Umsetzung von **12** zum *N*-(2,4-Dimethoxybenzyl)-*N'*-cyanomethylharnstoff.

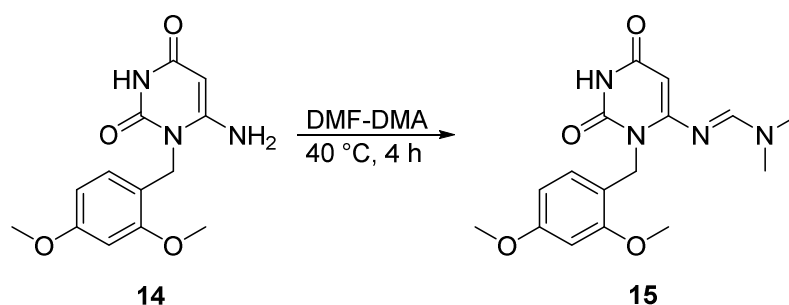
Die Darstellung des 6-Amino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)uracils (**14**) erfolgte aus **13** unter Zugabe von Natriummethanolat nach Holschbach *et al.* [88] mit einer Ausbeute von 54 % (Schema 4). Die verhältnismäßig geringe Ausbeute könnte zum Teil auf die Verunreinigung des Edukts zurückzuführen sein. Es wurde ein farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt

von 238 °C erhalten. Die analytischen Daten (^1H - und ^{13}C -NMR, Massenspektrometrie) sowie der Schmelzpunkt stimmen mit denen aus der Literatur überein [88].



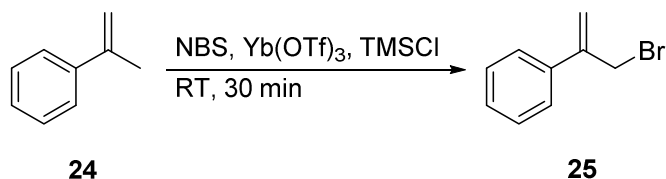
Schema 4: Darstellung von 6-Amino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)uracil mit Natriumethanolat aus **13**.

Das 1-(2,4-Dimethoxybenzyl)-6-(*N,N*-dimethylaminomethylen)uracil (**15**) wurde nach Holschbach *et al.* [88] über einen nukleophilen Angriff des *N,N*-Dimethylformamiddimethylacetals aus **14** gebildet (Schema 5). Die analytischen Daten (^1H -, ^{13}C -NMR, Massenspektrometrie) des farblosen Feststoffs stimmen mit denen aus der Literatur überein [88], der Schmelzpunkt liegt oberhalb von 300 °C. Die Ausbeute der Reaktion beträgt 69 %.



Schema 5: Umsetzung von **14** mit DMF-DMA zum 1-(2,4-Dimethoxybenzyl)-6-(*N,N*-dimethylaminomethylen)uracil.

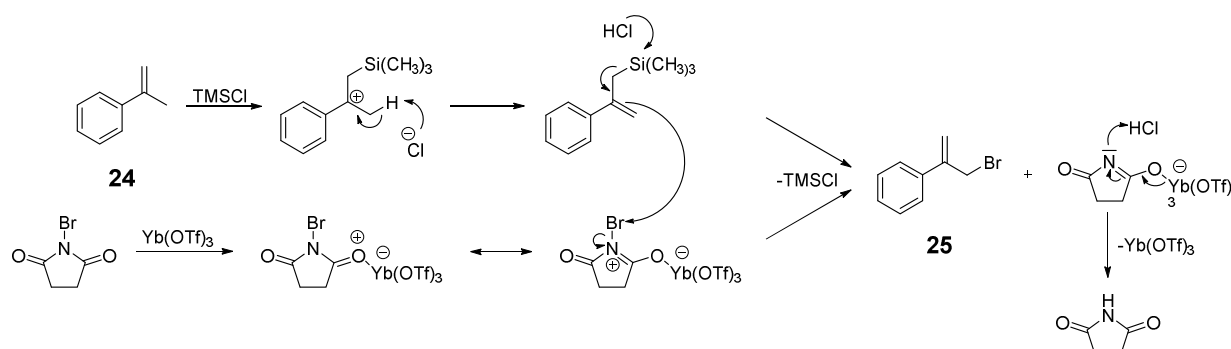
Die Darstellung von Allylphenylbromid (**25**) erfolgte nach Yamanaka *et al.* [103] aus α -Methylstyrol (**24**) unter Einsatz von *N*-Bromsuccinimid (NBS), Ytterbium(III)-trifluormethansulfonat und Trimethylsilylchlorid (TMS-Cl) (Schema 6). Das Produkt wurde massenspektrometrisch identifiziert und mit einer Ausbeute von 48 % als farbloses Öl erhalten.



Schema 6: Umsetzung von α -Methylstyrol zum Allylphenylbromid.

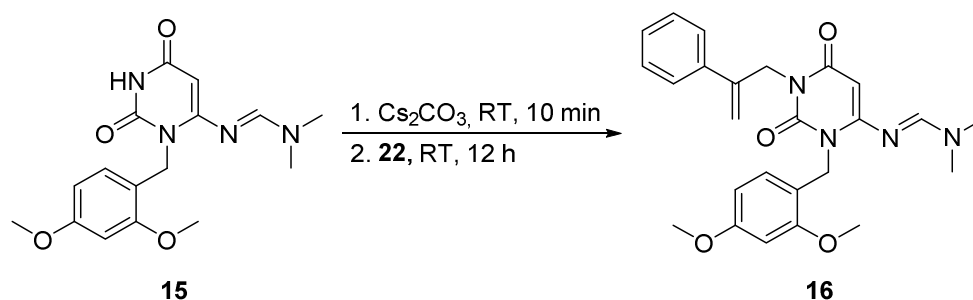
Im Gegensatz zu den bekannten allylischen Halogenierungen erfolgt die Reaktion nicht über radikalische Zwischenstufen, wodurch hier keine Bromierung am Benzylrest als Nebenreaktion stattfindet [102].

Ein möglicher Reaktionsmechanismus ist in Schema 7 dargestellt. Das Ytterbium(III)-trifluormethansulfonat dient als Lewis-Säure-Katalysator und bindet polar an das NBS. Die hierbei entstehende positive Ladung am Sauerstoffatom ist mesomeriestabilisiert und wandert zum weniger elektronegativen Stickstoffatom. Dadurch wird die Brom-Stickstoff-Bindung stärker polarisiert und das Brom elektrophiler. Das α -Methylstyrol (**24**) greift das TMS-Chlorid nukleophil an und bildet in α -Position eine positive Ladung aus. Diese wird durch Deprotonierung des β -Kohlenstoffatoms über das aus dem TMS-Chlorid stammenden Chloridion stabilisiert. Ein weiteres Chloridion greift nukleophil an dem gebundenen Siliciumatom an, die Bindung zum α -Methylstyrol löst sich und dieses greift seinerseits am elektrophilen Bromatom des NBS an. Das Brom wird von diesem abgespalten, wodurch sich das gewünschte Produkt **25** bildet. Durch Protonierung des Stickstoffatoms wird das Ytterbium(III)-trifluormethansulfonat zurückerhalten, zudem entsteht Succinimid.



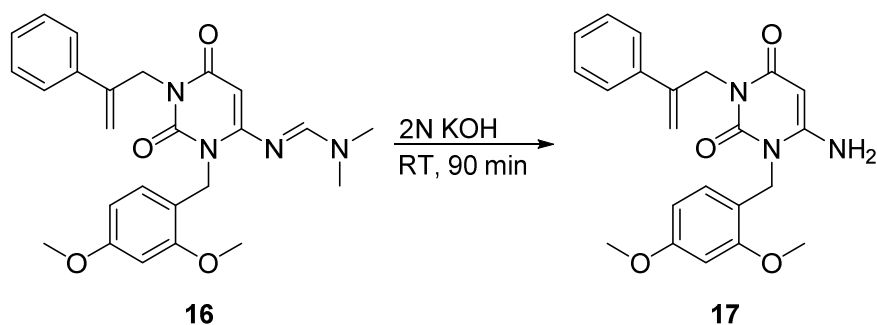
Schema 7: Möglicher Reaktionsmechanismus zur Darstellung des Allylphenylbromids.

Die Synthese des 3-Allylphenyl-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-6-(*N,N*-dimethylaminomethylen)-uracils (**16**) erfolgte in Anlehnung an Holschbach *et al.* [88] ausgehend von **15** mit Cäsiumcarbonat als Base und **25** als Reagenz über eine nukleophile Substitution (Schema 8). Das Produkt wurde über ^1H - und ^{13}C -NMR sowie massenspektrometrisch identifiziert. Es wurde ein farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 84 % erhalten.



Schema 8: Synthese des 3-Allylphenyl-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-6-(*N,N*-dimethylaminomethylen)uracils.

Die Abspaltung der 2,4-Dimethoxybenzylgruppe zum 3-Allylphenyl-6-amino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)uracil (**17**) erfolgte unter Zugabe von 2 N Kaliumhydroxid-Lösung in Anlehnung an Holschbach *et al.* [88] (Schema 9). Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten, der durch Massenspektrometrie identifiziert wurde. Die Ausbeute der Reaktion lag bei lediglich 13 %.

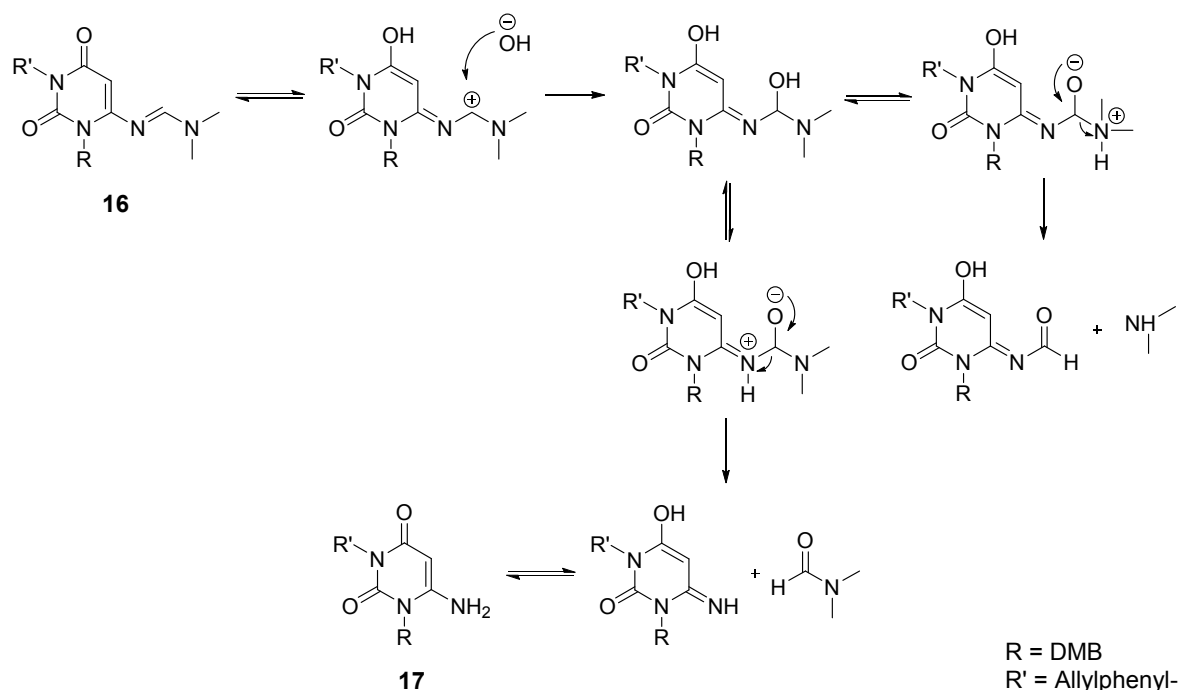


Schema 9: Umsetzung von **16** zum Aminoderivat 3-Allylphenyl-6-amino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)uracil.

Der Reaktionsmechanismus der Reaktion nach Vincent *et al.* [104] ist in Schema 10 dargestellt. Durch die tautomere Form des Uracils entsteht eine positive Ladung an der Methylgruppe zwischen den beiden Stickstoffatomen. Hier kann das Hydroxid der zugesetzten Base angreifen. Eines der beiden Stickstoffatome wird protoniert, während die Alkoholfunktion deprotoniert wird. Durch Umlagerung kommt es zur Spaltung, es entstehen ein Formamid sowie ein Amin. Da hier beide Stickstoffatome protoniert werden können, kann neben dem gewünschten Aminouracil **17** auch das unerwünschte Formamiduracil entstehen. Dies könnte die geringe Ausbeute der Reaktion erklären.

Da diese Reaktion nur mit sehr geringen Ausbeuten gelang, wurde in der weiteren Syntheseentwicklung auf die Allylphenylgruppe als Schutzgruppe verzichtet. An ihrer Stelle sollte eine 1,1-Dimethyl-2,2,2-trichlorethyloxycarbonylgruppe (TCBOC) eingeführt werden,

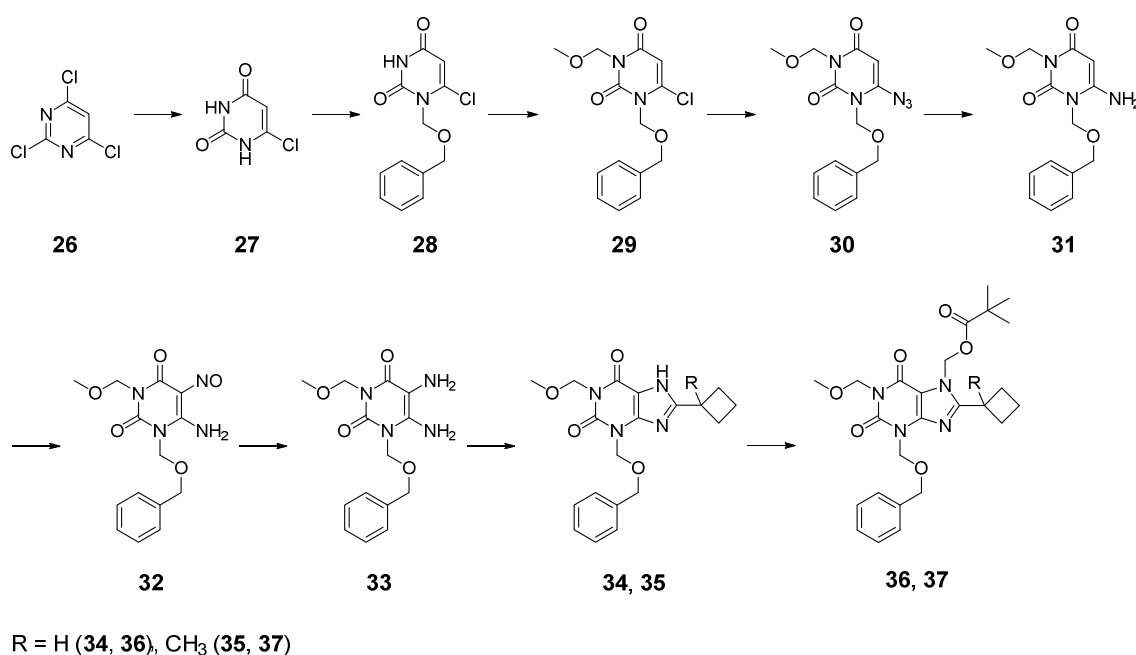
die reaktiv mit Zink entfernt werden kann [105] und säure- sowie basenstabil ist [106]. Daher ist sie ebenfalls für ein orthogonales Schutzgruppensystem geeignet. Die Einführung dieser Schutzgruppe über das entsprechende Chlorformiat gelang jedoch weder durch Zusatz von Pyridin nach Kamimura *et al.* [107] noch über den Einsatz von Kaliumcarbonat nach Holschbach *et al.* [88] zur Deprotonierung. Daher wurde dieser Syntheseweg ebenfalls verworfen.



Schema 10: Postulierter Reaktionsmechanismus der Abspaltung der *N,N*-Dimethylaminomethylengruppe nach Vincent *et al.* [104].

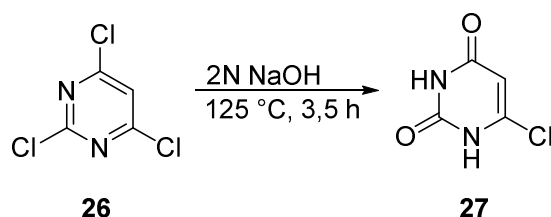
Über ein alternatives Konzept sollte neben dem 7-Pivaloyloxymethylsubstituenten die Methoxymethyl- (MOM) in die 1- sowie eine Benzyloxymethylschutzgruppe (BOM) in die 3-Position eingebracht werden. Auch hierbei handelt es sich um ein orthogonales Schutzgruppensystem. Während der Pivaloyloxymethylsubstituent weiterhin alkalisch in methanolischer Ammoniaklösung entfernt werden kann [88], lässt sich die Methoxymethylschutzgruppe in salzsaurem Medium abspalten [108]. Diese ist zudem stabil gegenüber basischen Bedingungen sowie gegenüber einer katalytischen Reduktion [102]. Die Benzyloxymethylschutzgruppe lässt sich reaktiv über Hydridtransfer entfernen [109], so dass die gewünschten Alkylsubstituenten über die entsprechenden Bromalkane eingeführt werden können. Die BOM-Gruppe ist ebenfalls basenstabil und lässt sich nicht durch Salzsäure abspalten [102].

Der entsprechende Syntheseweg zum geschützten Xanthinderivat ist in Schema 11 dargestellt. Ausgehend vom 2,4,6-Trichlorpyrimidin (**26**) war nach Hydrolyse zum 6-Chloruracil (**27**) zunächst geplant, die BOM- sowie die MOM-Schutzgruppe zur Darstellung des 1-Benzyloxymethyl-6-chlor-3-methoxymethyluracils (**29**) einzuführen. Nach Azidierung zum 6-Azido-1-benzyloxymethyl-3-methoxymethyluracil (**30**) und anschließender Reduktion zum Aminoderivat war dann wie oben das Uracil in 5 zu nitrosieren und im Anschluss zum Diamin zu reduzieren. Es sollte ein Ringschluss über das entsprechende Carbonsäureamid zum Xanthin erfolgen, welches in 7-Position mit der Pivaloyloxymethylschutzgruppe zu schützen war.



Schema 11: Ausgewählter Syntheseweg zur Darstellung eines orthogonal geschützten Xanthinderivats mit 1-Methoxymethyl-, 3-Benzyloxymethyl- sowie 7-Pivaloyloxymethylschutzgruppe.

Die Darstellung des 6-Chloruracils (**27**) gelang durch Hydrolyse von 2,4,6-Trichlorpyrimidin (**26**) mit 2 N Natriumhydroxid-Lösung nach Puig-De-La-Bellacasa *et al.* [110] mit einer Ausbeute von 79 % (Schema 12). Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten, der sich bei 274 °C zersetzt. Die analytischen Daten (¹H-, ¹³C-NMR) stimmen mit denen aus der Literatur überein [110, 111]. Das Massenspektrum zeigt Vielfache der erwarteten Masse, was die Bildung von Polymeren während der massenspektrometrischen Untersuchung anzeigt.



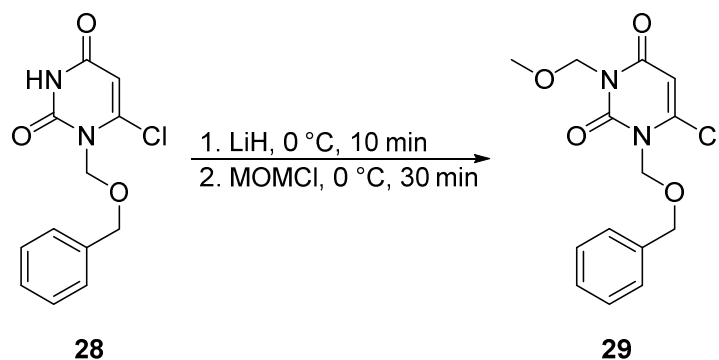
Schema 12: Darstellung von 6-Chloruracil aus 2,4,6-Trichlorpyrimidin.

Die Synthese des 1-Benzyloxymethyl-6-chloruracils (**28**) nach Edstrom *et al.* [112] gelang aus **27** durch Deprotonierung mit Lithiumhydrid und anschließender nukleophiler Substitution an Benzyloxymethylchlorid mit einer Ausbeute von 63 % (Schema 13). Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten. Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten, das Massenspektrum sowie der Schmelzpunkt von 158 °C stimmen mit den Werten aus der Literatur überein [111, 112].



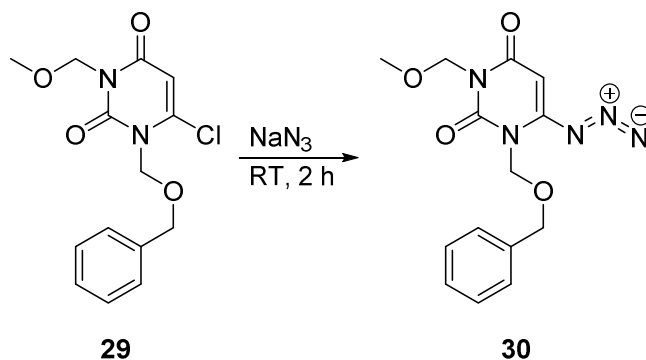
Schema 13: Umsetzung von 6-Chloruracil zu 1-Benzyloxymethyl-6-chloruracil.

Das 1-Benzyloxymethyl-6-chlor-3-methoxymethyluracil (**29**) konnte ebenfalls nach Edstrom *et al.* [112] ausgehend von **28** durch nukleophile Substitution an Methoxymethylchlorid unter vorheriger Zugabe von Lithiumhydrid mit einer Ausbeute von 77 % als farbloses Öl dargestellt werden (Schema 14). Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren stimmen mit denen aus der Literatur überein [112], das Massenspektrum zeigt das zu erwartende Signal.



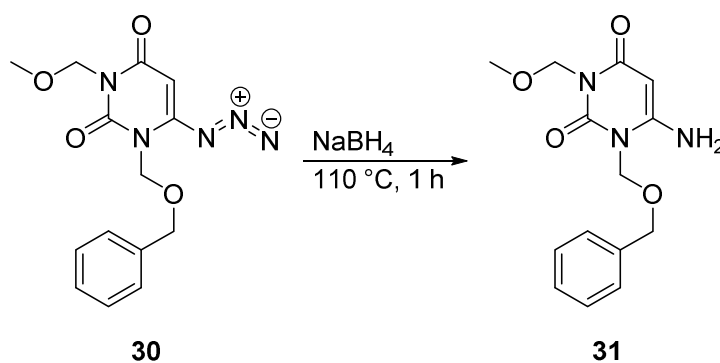
Schema 14: Darstellung von 1-Benzyloxymethyl-6-chlor-3-methoxymethyluracil.

Zur Darstellung von 6-Azido-1-benzyloxymethyl-3-methoxymethyluracil (**30**) wurde **29** mit Natriumazid in einer nukleophilen Substitution in Anlehnung an Sako *et al.* [113] umgesetzt (Schema 15). Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 90 % als farbloses Öl erhalten, welches massenspektrometrisch sowie über ^1H - und ^{13}C -NMR identifiziert werden konnte.



Schema 15: Synthese von 6-Azido-1-benzyloxymethyl-3-methoxymethyluracil.

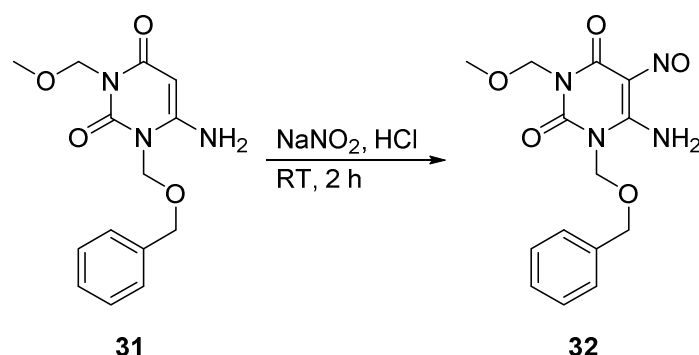
Die Umsetzung von **30** zum 6-Amino-1-benzyloxymethyl-3-methoxymethyluracil (**31**) mit Lithiumaluminiumhydrid in Anlehnung an Sako *et al.* [113] führte nicht zum gewünschten Produkt. Daher erfolgte die Darstellung von **31** in Anlehnung an Smith *et al.* [114] durch Reduktion mit Natriumborhydrid über Hydridtransfer (Schema 16). Das 6-Aminouracil-Derivat wurde mit einer Ausbeute von 88 % als farbloser Feststoff erhalten und über ^1H - und ^{13}C -NMR sowie massenspektrometrisch identifiziert.



Schema 16: Umsetzung von **30** zu 6-Amino-1-benzyloxymethyl-3-methoxymethyluracil.

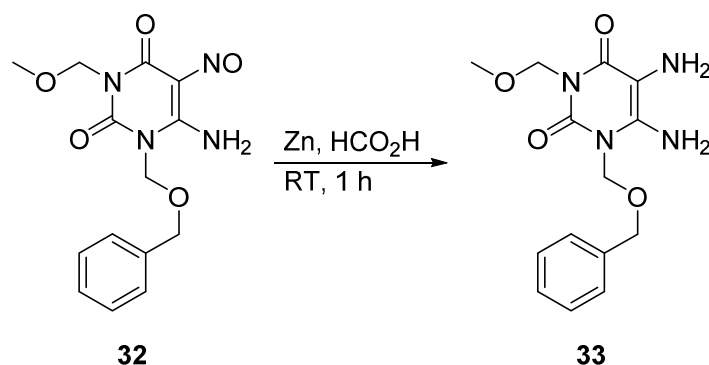
Die Synthese des 6-Amino-1-benzyloxymethyl-3-methoxymethyl-5-nitrosouracils (**32**) erfolgte in Anlehnung an Cottam *et al.* [115] durch Nitrosierung mit Natriumnitrit im sauren Medium (Schema 17). Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 68 % als violetter Feststoff mit

einem Schmelzpunkt von 146 °C erhalten. Es liegt in DMSO-Lösung in seiner tautomeren Oxim-Form vor und wurde massenspektrometrisch sowie über ^1H - und ^{13}C -NMR identifiziert.



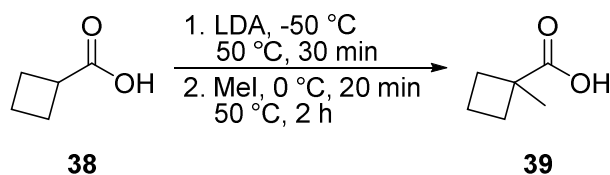
Schema 17: Synthese des 6-Amino-1-benzyloxymethyl-3-methoxymethyl-5-nitrosouracils aus **31**.

Die Umsetzung von **32** mit Natriumdithionit in Anlehnung an Holschbach *et al.* [88] führte nicht zum gewünschtem 1-Benzyloxymethyl-5,6-diamino-3-methoxymethyluracil (**33**). Daher erfolgte die Darstellung von **33** mit elementarem Zink in Ameisensäure aus **32** in Anlehnung an Gowda *et al.* [116] über eine Clemmensen-ähnliche Hydrierung (Schema 18). Es konnte mit einer Ausbeute von 45 % als farbloser Feststoff erhalten und über ^1H - und ^{13}C -NMR sowie massenspektrometrisch identifiziert werden.



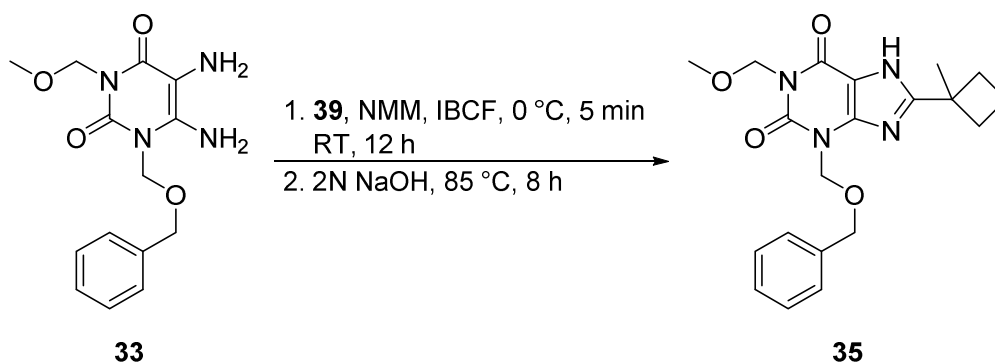
Schema 18: Darstellung von 1-Benzyloxymethyl-5,6-diamino-3-methoxymethyluracil.

Die Darstellung der 1-Methylcyclobutan-1-carbonsäure (**39**) aus Cyclobutancarbonsäure (**38**) erfolgte durch Deprotonierung mit *in situ* hergestelltem Lithiumdiisopropylamid und anschließender nukleophiler Substitution an Methyljodid nach Cowling *et al.* [117] (Schema 19). Es wurde ein farbloses Öl mit einer Ausbeute von 87 % erhalten. Die analytischen Daten (^1H -, ^{13}C -NMR) stimmen mit denen aus der Literatur überein [118], das Massenspektrum zeigt das zu erwartende Signal.



Schema 19: Synthese der 1-Methylcyclobutan-1-carbonsäure.

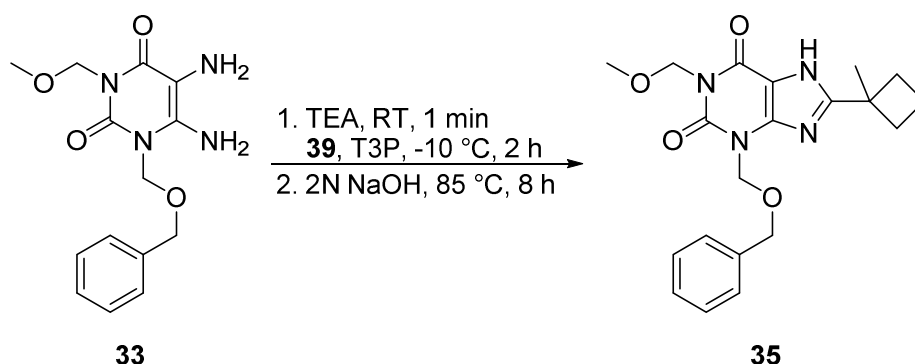
Zur Synthese des 3-Benzoyloxymethyl-1-methoxymethyl-8-(1-methylcyclobutyl)xanthins (**35**) wurde zunächst das gemischte Anhydrid aus **33** mit Isobutylchlorformiat in Anlehnung an Hoffmann *et al.* [119] hergestellt. Hier erfolgte eine nukleophile Substitution von **33** zum Amid-Intermediat, welches zum gewünschten Produkt cyclokondensiert wurde (Schema 20; in Anlehnung an Holschbach *et al.* [60]). Es wurde ein farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 21 % erhalten, welcher über ^1H - und ^{13}C -NMR sowie massenspektrometrisch identifiziert wurde.



Schema 20: Darstellung von 3-Benzoyloxymethyl-1-methoxymethyl-8-(1-methylcyclobutyl)-xanthin über das gemischte Anhydrid der Carbonsäure.

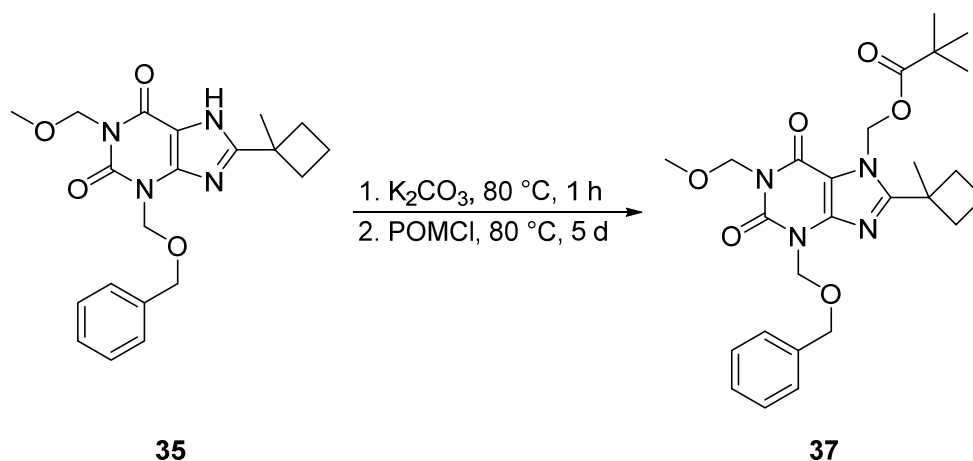
Aufgrund der geringen Ausbeute der vorangegangenen Synthese erfolgte die Umsetzung von **33** in einem alternativen Ansatz über die Zugabe von Tripropylphosphonsäureanhydrid (T3P) in Anlehnung an Dunetz *et al.* (Schema 21) [120]. Hierbei bindet das T3P an die zuvor deprotonierte Carbonsäure. Durch eine nukleophile Substitution einer Aminfunktion von **33** an die Carbonylfunktion des Phosphonsäureesters wird das intermediäre Amid gebildet, welches weiter in Anlehnung an Holschbach *et al.* [88] zum Xanthin kondensiert wird. Das Produkt konnte als weißer Feststoff erhalten werden, die analytischen Daten stimmen mit denen des obigen Produkts überein. Die Ausbeute lag mit 10 % jedoch noch unter derjenigen aus der Darstellung von **35** über das gemischte Anhydrid der Carbonsäure. Der Grund für die geringen Ausbeuten bei beiden Verfahren ist vermutlich im elektronen-

ziehende Effekt der MOM-Schutzgruppe zu suchen, durch welchen die Aminfunktion in der 6-Position unreaktiver wird.



Schema 21: Synthese von 3-Benzylloxymethyl-1-methoxymethyl-8-(1-methylcyclobutyl)-xanthin über den Phosphonsäureester der Carbonsäure.

Die Umsetzung von **35** zum 3-Benzylloxymethyl-1-methoxymethyl-8-(1-methylcyclobutyl)-7-pivaloyloxymethylxanthin (**37**) erfolgte durch Deprotonierung mit Kaliumcarbonat und anschließender nukleophiler Substitution am Chlormethylpivalat in Anlehnung an Holschbach *et al.* [88] (Schema 22). Das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 72 % als blass gelbes Öl erhalten und durch ^1H - und ^{13}C -NMR sowie über die Massenspektrometrie identifiziert werden.



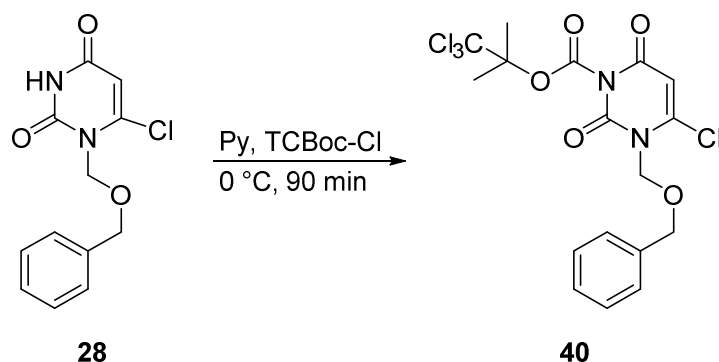
Schema 22: Umsetzung von **35** zum 3-Benzylloxymethyl-1-methoxymethyl-8-(1-methylcyclobutyl)-7-pivaloyloxymethylxanthin.

Die Entfernung der BOM-Schutzgruppe durch Hydrierung mit Hydrazinmonoformiat, *in situ* hergestellt aus Hydrazinmonohydrat und Ameisensäure, in Anlehnung an Gowda *et al.* [121] führte zur gleichzeitigen Abspaltung des POM-Substituenten. Dies war ebenfalls bei der

Verwendung von Palladium-Kohlenstoff (10 %) und Ammoniumformiat als Reduktionsmittel in Anlehnung an Alewi *et al.* [122] der Fall. Bei Verwendung von Magnesium und Ammoniumformiat in Anlehnung an Gowda *et al.* [109] als Reduktionsmittel wurde jedoch statt der BOM-Schutzgruppe der POM-Substituent abgespalten. Es stellte sich heraus, dass eine selektive Entschützung der 3-Position reaktiv nicht möglich ist. Da durch den Einsatz von Säuren zur Entfernung der BOM-Gruppe ebenfalls die 1-Position mit entschützt würde, wurde das Konzept der Orthogonalität mit diesen Schutzgruppen ebenfalls verworfen.

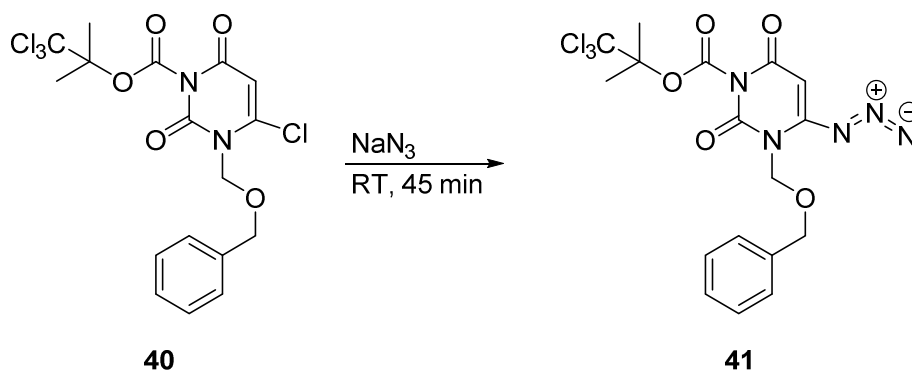
Alternativ wurde daher versucht, die MOM- durch die TCBOC-Schutzgruppe zu ersetzen und zusammen mit dem BOM-Substituenten in Position 3 und der POM-Gruppe in Position 7 zu verwenden. Der TCBOC-Substituent ist sehr säure- und basenstabil und ist so für das Schutzgruppensystem prinzipiell geeignet. Er kann reaktiv mit Zink in Essigsäure entfernt werden [106]. Der weitere Syntheseweg sollte analog wie oben beschrieben erfolgen.

Die Darstellung des 1-Benzoyloxymethyl-6-chlor-3-(1,1-dimethyl-2,2,2-trichlorethoxycarbonyl)uracils (**40**) erfolgte mit 1,1-Dimethyl-2,2,2-trichlorethylchlorformiat ausgehend von **28** in einer nukleophilen Substitution in Anlehnung an Kamimura *et al.* [107] mit einer Ausbeute von 91 % (vgl. Schema 23). Der farblose Feststoff besitzt einen Schmelzpunkt von 133 °C und wurde massenspektrometrisch sowie über NMR (^1H -, ^{13}C -) identifiziert.



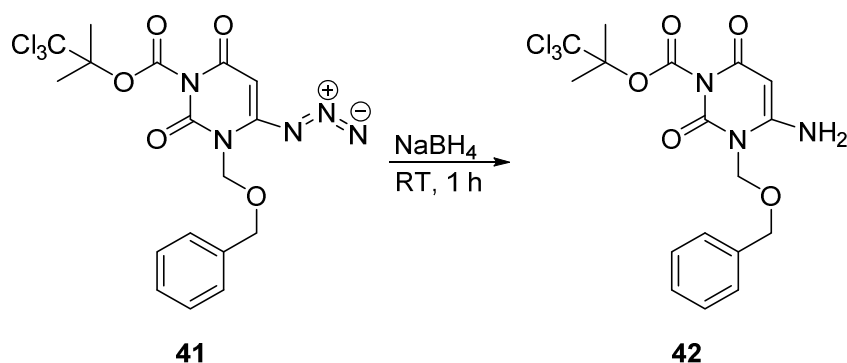
Schema 23: Darstellung von 1-Benzoyloxymethyl-6-chlor-3-(1,1-dimethyl-2,2,2-trichlorethyl-oxycarbonyl)uracil.

Die Umsetzung von **40** zum 6-Azido-1-benzoyloxymethyl-3-(1,1-dimethyl-2,2,2-trichlorethyl-oxycarbonyl)uracil (**41**) erfolgte wie oben in Anlehnung an Sako *et al.* [113] mit Natriumazid in einer nukleophilen Substitution (Schema 24). Das Produkt konnte als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 88 % erhalten und über ^1H - und ^{13}C -NMR sowie Massenspektrometrie identifiziert werden. Es zersetzt sich bei 147 °C.



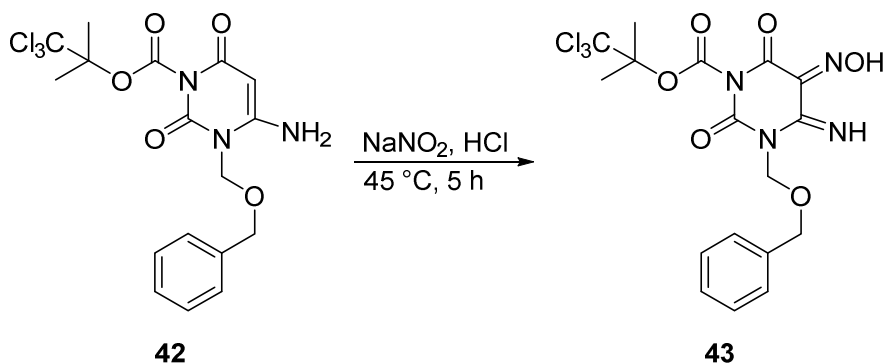
Schema 24: Umsetzung von **35** zum 6-Azido-1-benzyloxymethyl-3-(1,1-dimethyl-2,2,2-trichlorethyloxycarbonyl)uracil.

Die Reduktion der Verbindung **41** zum 6-Amino-1-benzyloxymethyl-3-(1,1-dimethyl-2,2,2-trichlorethyloxycarbonyl)uracil (**42**) erfolgte wie oben über Hydridtransfer mit Natriumborhydrid in Anlehnung an Smith *et al.* [114] (Schema 25). Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 45 % erhalten. Es wurde über Massenspektrometrie sowie ^1H - und ^{13}C -NMR identifiziert und lag als farbloser Feststoff vor.



Schema 25: Reduktion von **41** zum 6-Amino-1-benzyloxymethyl-3-(1,1-dimethyl-2,2,2-trichlorethyloxycarbonyl)uracil.

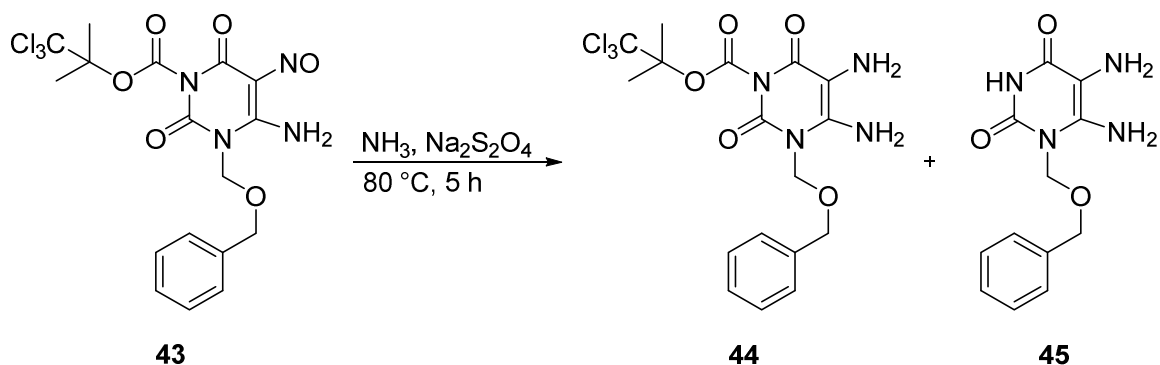
Die Nitrosierung von **42** zum 6-Amino-1-benzyloxymethyl-5-nitroso-3-(1,1-dimethyl-2,2,2-trichlorethyloxycarbonyl)uracil (**43**) erfolgte wie oben mit Natriumnitrit in saurem Medium in Anlehnung an Cottam *et al.* [115]. Das Produkt liegt in DMSO gelöst in seiner tautomeren Oximform vor und konnte als violetter Farbstoff mit einer Ausbeute von 45 % erhalten werden (Schema 26). Der Schmelzpunkt der Substanz liegt bei 138 °C, die Identifizierung erfolgte über ^1H - und ^{13}C -NMR sowie über Massenspektrometrie.



Schema 26: Nitrosierung von **42** zum 6-Amino-1-benzyloxymethyl-5-nitroso-3-(1,1-dimethyl-2,2,2-trichlorethyloxycarbonyl)uracil.

Die Darstellung des 1-Benzyloxymethyl-5,6-diamino-3-(1,1-dimethyl-2,2,2-trichlorethyloxycarbonyl)uracils (**44**) erfolgte durch Reduktion von **43** mit Natriumdithionit in Anlehnung an Holschbach *et al.* [88] (Schema 27). Es wurde ein farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 18 % erhalten, welcher massenspektrometrisch identifiziert wurde.

Bei dieser Reaktion wurde jedoch bevorzugt die TCBOC-Schutzgruppe mit entfernt, und es entstand das 1-Benzyloxymethyl-5,6-diaminouracil (**45**) mit einer Ausbeute von 51 % als farbloser Feststoff (Schema 27). Dieser wurde massenspektrometrisch sowie über ^1H - und ^{13}C -NMR identifiziert.



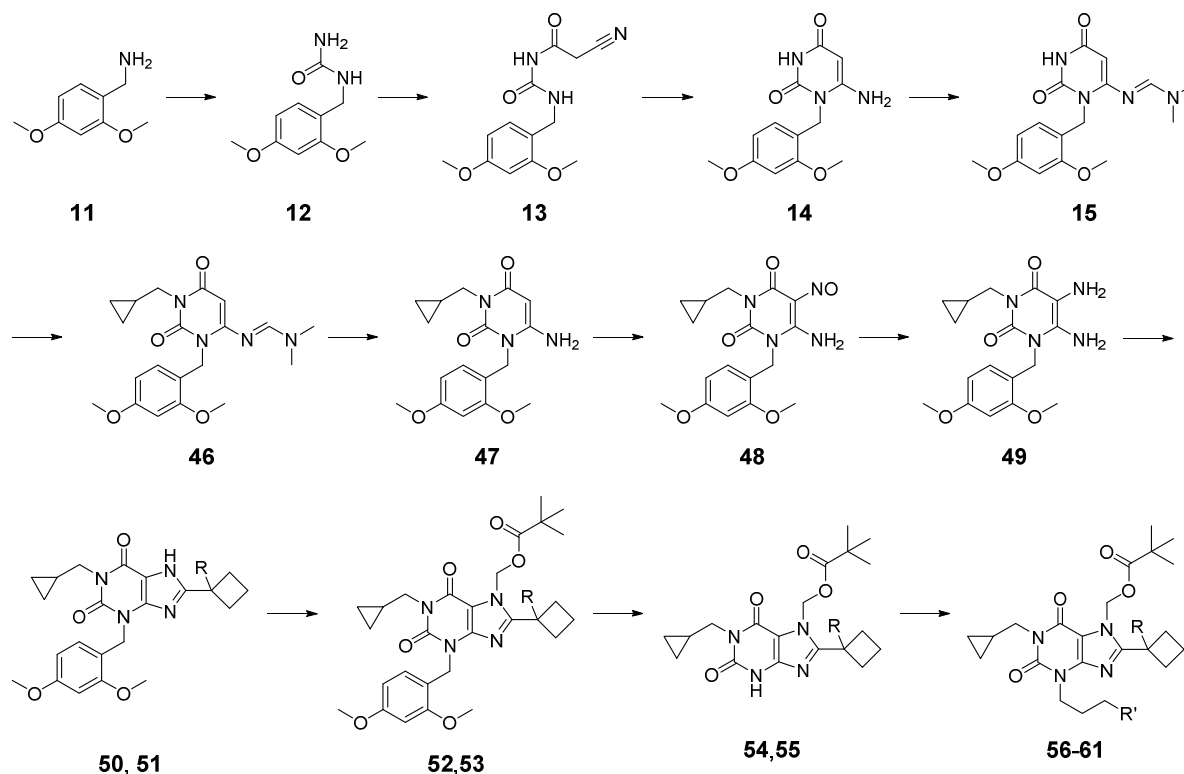
Schema 27: Reduktion von **43** mit Natriumdithionit.

In einem weiteren Ansatz zur Reduktion der Nitrosogruppe von **43** mit Natriumborhydrid in Anlehnung an Smith *et al.* [114] konnte kein Umsatz erzielt werden.

Trotz der Erprobung mehrerer Synthesekonzepte für verschiedene Schutzgruppenvariationen (Phenylallyl-/DMB-/POM-; TCBOC-/DMB-/POM-; MOM-/BOM-/POM-; TCBOC-/BOM-/POM-) ist es nicht gelungen, ein orthogonal geschütztes Xanthinderivat darzustellen. Daher

wurde das orthogonale Schutzgruppenkonzept als Synthesemethode verworfen und versucht, die Alkylsubstituenten (zunächst Cyclopropylmethyl- und 1-Methylethyl-) direkt in die 3-Position des BOM-geschützten Uracils einzubringen. Die weitere Synthese sollte dann analog der oben beschriebenen Synthese (mit MOM in der 1-Position) erfolgen. Die Einführung der Alkylsubstituenten gelang jedoch weder in Anlehnung an Holschbach *et al.* [88] unter Zusatz von Cäsiumcarbonat zu **28**, noch durch Einsatz von Lithiumhydrid zur Deprotonierung in Anlehnung an Edstrom *et al.* [112].

Aus diesem Grund wurde zur Darstellung neuer Xanthinderivate zunächst auf den direkten Weg mit DMB als Schutzgruppe in der 3-Position zurückgegriffen. Der Focus lag dabei zu Beginn auf der Darstellung der beiden 1-Cyclopropylmethyl-derivate **1** und **2**. Der entsprechende Syntheseweg ist Schema 28 zu entnehmen.



R = H (**50**, **52**, **54**, **56**, **58**, **60**), CH₃ (**51**, **53**, **55**, **57**, **59**, **61**)

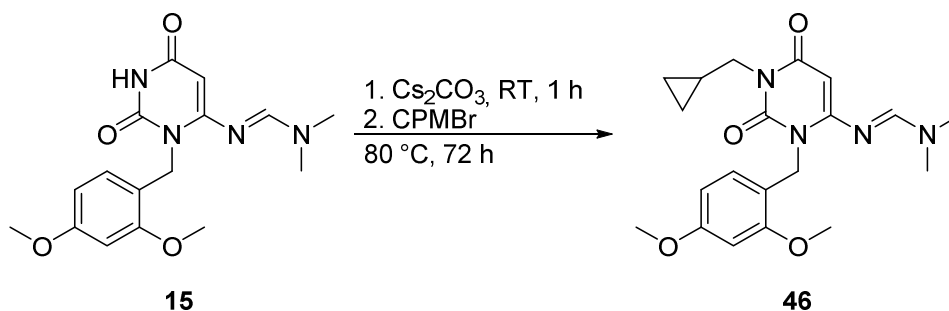
R' = F (**56**, **57**), OH (**58**, **59**), OMs (**60**, **61**)

Schema 28: Geplante Darstellung der Xanthinderivate und der Mesylatvorläufer auf direktem Weg ohne orthogonales Schutzgruppensystem.

Ausgehend von dem oben bereits beschriebenen 1-(2,4-Dimethoxybenzyl)-6-(*N,N*-dimethylaminomethylen)uracil (**15**) war der Alkylsubstituent in Position 1 einzuführen. Die *N,N*-Dimethylaminomethylen-Schutzgruppe sollte anschließend wie oben entfernt, sowie das Uracil

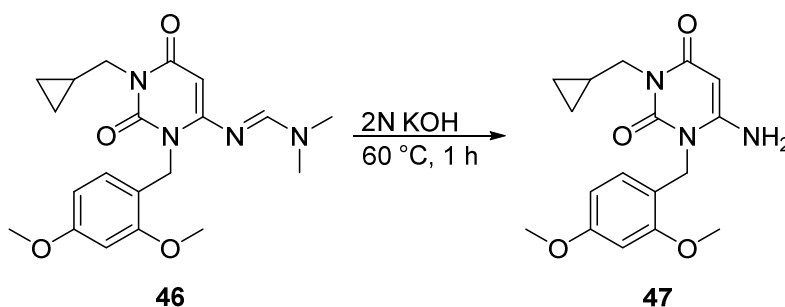
in der 5-Position nitrosiert und im Anschluss zum Diamin reduziert werden. Der Ringschluss zum Xanthin sollte über das entsprechende Carbonsäureamid erfolgen, welches in 7-Position mit der Pivaloyloxymethylschutzgruppe zu schützen war. Die DMB-Schutzgruppe war anschließend zu entfernen, um entweder die 3-Fluorpropylsubstituenten (**56**, **57**) einzuführen oder um über die 3-(3-Hydroxypropyl)derivate (**58**, **59**) die Mesylatvorläufer (**60**, **61**) für die [^{18}F]-Markierungen darzustellen. Die 3-(3-Fluorpropyl)xanthinderivate sollten anschließend in der 7-Position entschützt werden, um die Zielverbindungen **1** und **2** darzustellen.

Das 3-Cyclopropylmethyl-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-6-(*N,N*-dimethylaminomethylen)uracil (**46**) konnte ausgehend von **15** durch eine nukleophile Substitution an Brommethylcyclopropan (CPMBr) in Anlehnung an Holschbach *et al.* [88] dargestellt werden (Schema 29). Es wurde mit einer Ausbeute von 58 % als farbloser Feststoff erhalten und über ^1H - und ^{13}C -NMR sowie über Massenspektrometrie identifiziert. Der Schmelzpunkt der Verbindung liegt bei $146\text{ }^\circ\text{C}$.



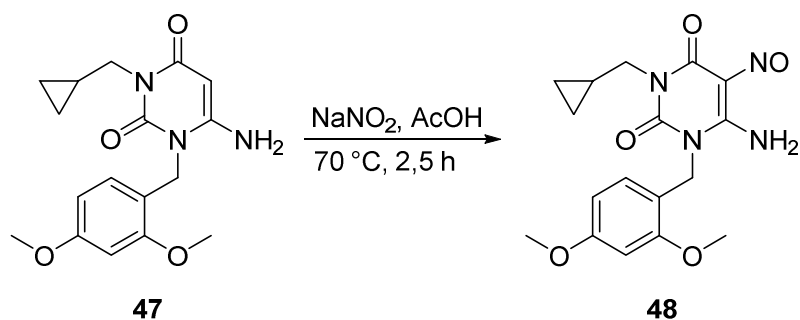
Schema 29: Darstellung von 3-Cyclopropylmethyl-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-6-(*N,N*-dimethylaminomethylen)uracil.

Die Synthese des 6-Amino-3-cyclopropylmethyl-1-(2,4-dimethoxybenzyl)uracils **47** erfolgte durch Hydrolyse mit Kaliumhydroxid-Lösung in Anlehnung an Holschbach *et al.* [88] (Schema 30). Es wurde mit einer Ausbeute von 90 % als farbloses Öl erhalten und über Massenspektrometrie sowie NMR (^1H -, ^{13}C -) identifiziert.



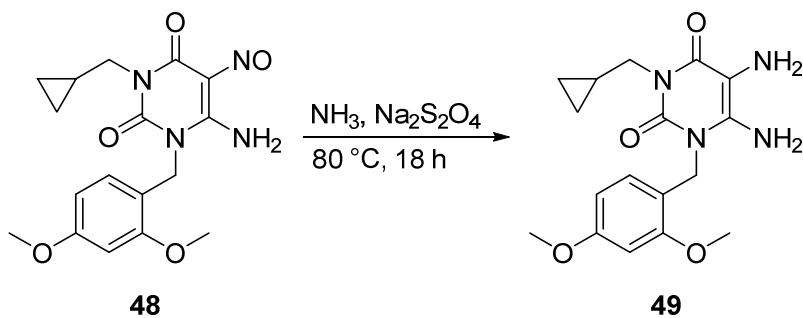
Schema 30: Synthese von 6-Amino-3-cyclopropylmethyl-1-(2,4-dimethoxybenzyl)uracil.

Zur Darstellung des 6-Amino-3-cyclopropylmethyl-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-5-nitrosouracils (**48**) wurde **47** mit Natriumnitrit in essigsäurem Medium in Anlehnung an Holschbach *et al.* [88] umgesetzt (Schema 31). In DMSO gelöst liegt die Nitrosoverbindung in der tautomeren Oximform vor. Sie wurde mit einer Ausbeute von 55 % und einem Schmelzpunkt von 161 °C als violetter Feststoff erhalten. Die Identifizierung gelang über ^1H - und ^{13}C -NMR sowie massenspektrometrisch.



Schema 31: Darstellung des 6-Amino-3-cyclopropylmethyl-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-5-nitrosouracils aus **42**.

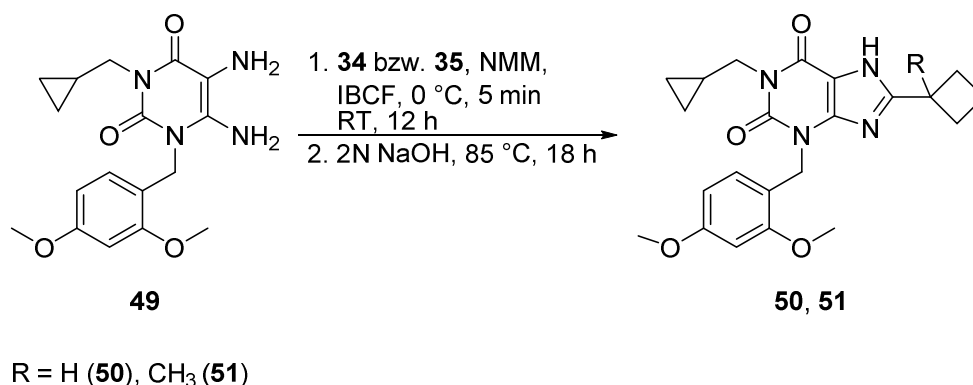
Die Synthese des 3-Cyclopropylmethyl-5,6-diamino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)uracils (**49**) erfolgte ausgehend von **48** wie oben durch Reduktion mit Natriumdithionit unter Zusatz von Ammoniak in Anlehnung an Holschbach *et al.* [88] (Schema 32). Die Ausbeute der Reaktion betrug 81 %. Der erhaltene farblose Feststoff besitzt einen Schmelzpunkt von 188 °C und wurde über Massenspektrometrie sowie ^1H - und ^{13}C -NMR identifiziert.



Schema 32: Synthese von 3-Cyclopropylmethyl-5,6-diamino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)uracil.

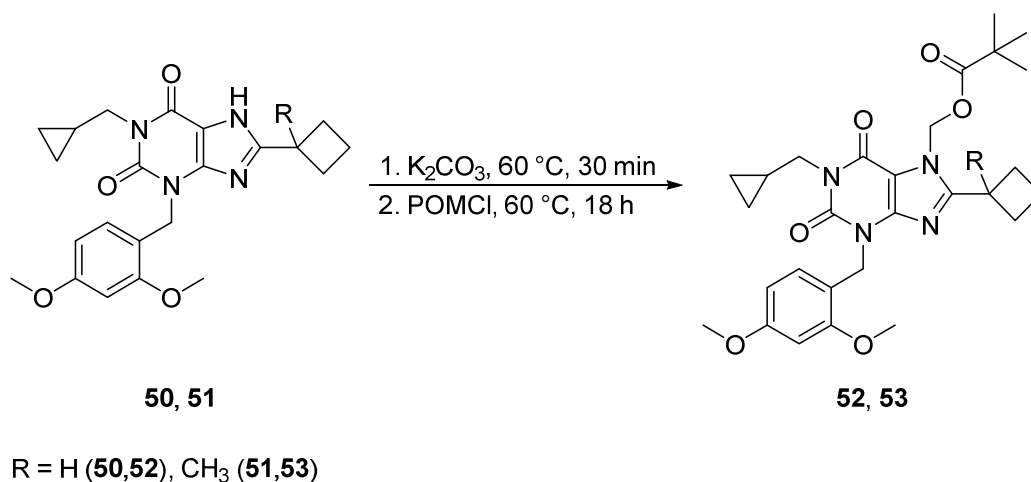
Zur Umsetzung von **49** zu den 8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(2,4-dimethoxybenzyl)-xanthinen (**50**, **51**) wurde wie oben beschrieben das gemischte Anhydrid von **38** bzw. **39** mit Isobutylchlorformiat in Anlehnung an Hoffmann *et al.* hergestellt [119] und dieses in einer anschließenden nukleophilen Substitution zum Amid-Intermediat von **49** umgesetzt, welches zum gewünschten Produkt kondensiert wurde (Schema 33; in Anlehnung an Holschbach *et*

al. [60]). Das 8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-1-(2,4-dimethoxybenzyl)xanthin (**50**) konnte mit einer Ausbeute von 69 % als farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 262 °C, das 1-Cyclopropylmethyl-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-8-(1-methylcyclobutyl)xanthin (**51**) mit einer Ausbeute von 66 %, ebenfalls als farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 251 °C erhalten werden. Beide Verbindungen wurden über ^1H - und ^{13}C -NMR sowie über Massenspektrometrie identifiziert.



Schema 33: Umsetzung von **49** zu den (substituierten) 8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(2,4-dimethoxybenzyl)xanthinen **50** und **51**.

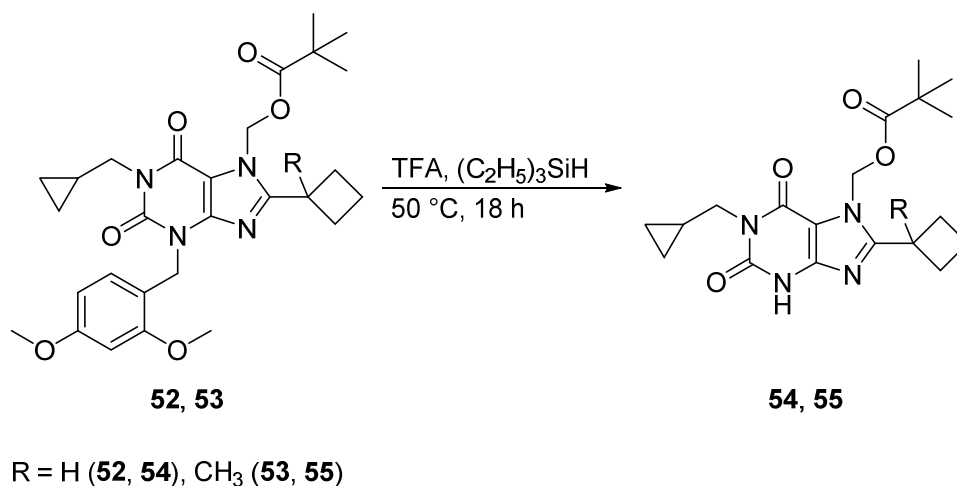
Die Darstellung der entsprechenden 8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(2,4-dimethoxybenzyl)-7-pivaloyloxymethylxanthine (**52**, **53**) erfolgte wie oben durch Deprotonierung mit Kaliumcarbonat und anschließender nukleophiler Substitution am Chlormethylpivalat in Anlehnung an Holschbach *et al.* [88] (Schema 34).



Schema 34: Darstellung der (substituierten) 8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(2,4-dimethoxybenzyl)-7-pivaloyloxymethylxanthine **52** und **53**.

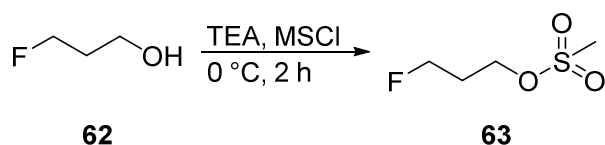
Das 8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(2,4-dimethoxybenzyl)-7-pivaloyloxymethylxanthin (**52**) wurde mit einer Ausbeute von 88 % als blass gelbes Öl erhalten, das 1-Cyclopropylmethyl-3-(2,4-dimethoxybenzyl)-8-(1-methylcyclobutyl)-7-pivaloyloxymethylxanthin (**53**) mit einer Ausbeute von 72 % als farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 142 °C. Beide Verbindungen wurden massenspektrometrisch sowie über NMR (^1H -, ^{13}C -) identifiziert.

Die weitere Synthese zu den 8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-7-pivaloyloxymethylxanthinen (**54**, **55**) gelang durch Schutzgruppenabspaltung mit Trifluoressigsäure in Anlehnung an Shinozuka *et al.* [123] (Schema 35). Das Triethylsilan dient hierbei dem Abfangen der entstehenden Kationen zur Verhinderung von Polymerbildung. Das 8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-7-pivaloyloxymethylxanthin (**54**) wurde mit einer Ausbeute von 46 % als farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 153 °C erhalten. Das 1-Cyclopropylmethyl-8-(1-methylcyclobutyl)-7-pivaloyloxymethylxanthin (**55**) wurde ebenfalls als farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 76 °C und einer Ausbeute von 76 % synthetisiert. Beide Xanthinderivate wurden eindeutig identifiziert (^1H -, ^{13}C -NMR, Massenspektrometrie).



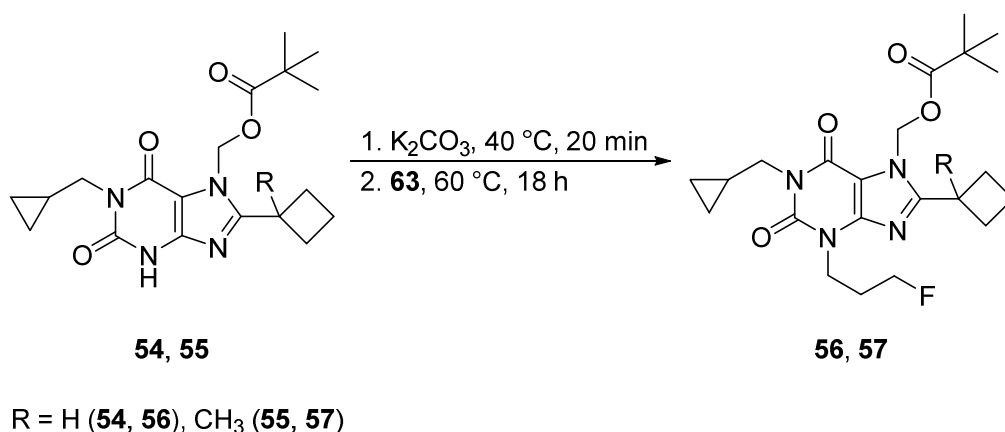
Schema 35: Synthese der (substituierten) 8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-7-pivaloyloxymethylxanthine **54** und **55**.

Die Umsetzung von 3-Fluorpropanol (**62**) zum Methansulfonsäure-3-fluorpropylester (**63**) zur Einführung des 3-Fluorpropylsubstituenten erfolgte über eine nukleophile Substitution an Methansulfonylchlorid unter Zugabe von Triethylamin nach Bender *et al.* [124] (Schema 36). Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 81 % als farbloses Öl erhalten. Die analytischen Daten (Massenspektrometrie, ^1H -, ^{13}C -NMR) stimmen mit denen aus der Literatur überein.



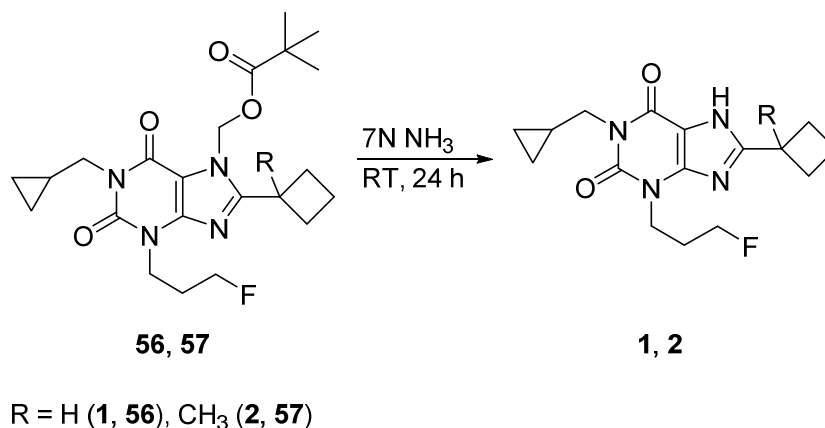
Schema 36: Darstellung des Methansulfonsäure-3-fluorpropylesters.

Die 8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(3-fluorpropyl)-7-pivaloyloxymethylxanthine (**56**, **57**) wurden aus **54** bzw. **55** durch Deprotonierung mit Kaliumcarbonat und anschließender nukleophiler Substitution an **63** in Anlehnung an Holschbach *et al.* [88] synthetisiert (Schema 37). Das 8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(3-fluorpropyl)-7-pivaloyloxymethylxanthin (**56**) wurde mit einer Ausbeute von 92 % als farbloses Öl, das 1-Cyclopropylmethyl-3-(3-fluorpropyl)-8-(1-methylcyclobutyl)-7-pivaloyloxymethylxanthin (**57**) als farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 134 °C und einer Ausbeute von 62 % erhalten. Beide Verbindungen wurden über ^1H - und ^{13}C -NMR sowie massenspektrometrisch identifiziert.



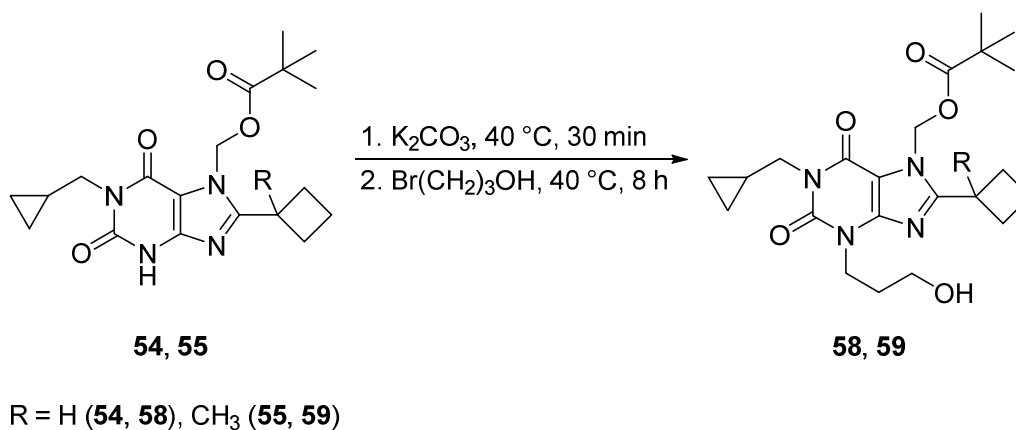
Schema 37: Synthese der (substituierten) 8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(3-fluorpropyl)-7-pivaloyloxymethylxanthine **56** und **57**.

Die Darstellung der beiden Zielverbindungen **1** und **2** erfolgte schließlich aus **56** bzw. **57** in methanolischer Ammoniaklösung in Anlehnung an Holschbach *et al.* [88] (Schema 38). Das 8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(3-fluorpropyl)xanthin (**1**) (CBCPM) wurde mit einer Ausbeute von 87 % als farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 206 °C erhalten. Das 1-Cyclopropylmethyl-3-(3-fluorpropyl)-8-(1-methylcyclobutyl)xanthin (**2**) (CPMMCB) konnte ebenfalls als farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 153 °C und einer Ausbeute von 93 % dargestellt werden. Beide Xanthinderivate wurden in jeweils 13 Stufen mit Gesamtausbeuten von 1,8 % (**1**) bzw. 1,5 % (**2**) synthetisiert und über ^1H - und ^{13}C -NMR sowie über Massenspektrometrie identifiziert.



Schema 38: Darstellung der (substituierte) 8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(3-fluorpropyl)xanthine **1** und **2**.

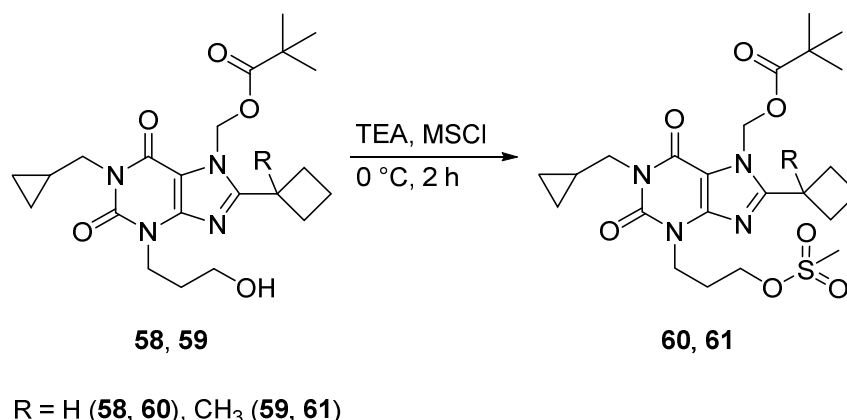
Die Umsetzung von **54** bzw. **55** zu den 8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(3-hydroxypropyl)-7-pivaloyloxymethylxanthinen (**58, 59**) erfolgte durch Deprotonierung mit Kaliumcarbonat und anschließender nukleophiler Substitution an 1-Brompropanol in Anlehnung an Holschbach *et al.* [88] (Schema 39). Das 8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(3-hydroxypropyl)-7-pivaloyloxymethylxanthin (**58**) wurde mit einer Ausbeute von 56 %, und das 1-Cyclopropylmethyl-3-(3-hydroxypropyl)-8-(1-methylcyclobutyl)-7-pivaloyloxymethylxanthin (**59**) mit einer Ausbeute von 69 % als farblose Öle erhalten. Sie wurden mittels ¹H- und ¹³C-NMR sowie Massenspektrometrie identifiziert.



Schema 39: Synthese der (substituierten) 8-Cyclobutyl-1-cyclopropyl-3-(3-hydroxypropyl)-7-pivaloyloxymethylxanthine **58** und **59**.

Die Synthese der Vorläuferverbindungen für die Darstellung der ¹⁸F-markierten Xanthinderivate [¹⁸F]CBCPM (**66**) und [¹⁸F]CPMMCB (**67**) erfolgte ausgehend von **58** bzw. **59** in einer nukleophilen Substitution an Methansulfonylchlorid unter Zugabe von Triethylamin in

Anlehnung an Bender *et al.* [124] (Schema 40). Das 8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(3-methylsulfonyloxypropyl)-7-pivaloyloxymethylxanthin (**60**) konnte mit einer Ausbeute von 69 % als farbloser Feststoff erhalten werden. Der Schmelzpunkt dieser Verbindung beträgt 109 °C. Das 1-Cyclopropylmethyl-8-(1-methylcyclobutyl)-3-(3-methylsulfonyloxypropyl)-7-pivaloyloxymethylxanthin (**61**) wurde ebenfalls als farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 115 °C und einer Ausbeute von 59 % dargestellt. Beide Verbindungen wurden über Massenspektrometrie und ^1H - sowie ^{13}C -NMR identifiziert. Die Vorläuferverbindungen konnten über insgesamt 13 Stufen mit Ausbeuten von 0,8 % (**60**) bzw. 1,1 % (**61**) synthetisiert werden.

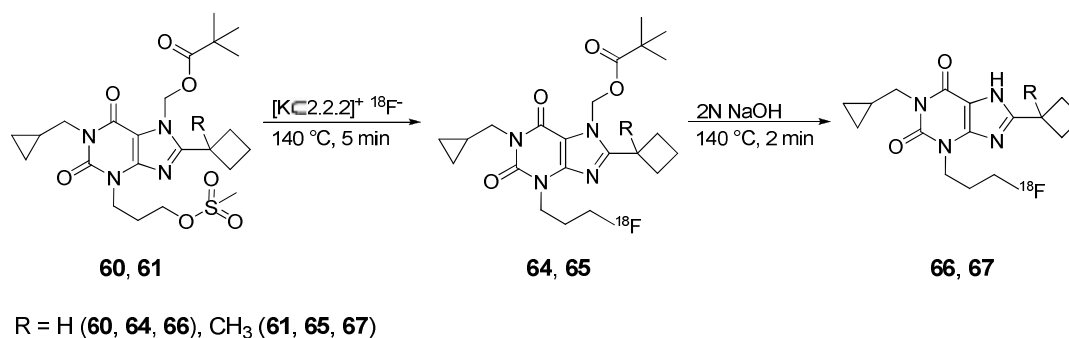


Schema 40: Synthese der Vorläuferverbindungen **60** und **61** für die ^{18}F -Markierungen.

Mit diesem linearen Syntheseweg ist es somit gelungen, über die versatile Zwischenstufe **49** eine Uracilverbindung darzustellen, durch welche in der 3- und der 8-Position beliebig substituierbare Xanthinderivate ohne erneute vollständige 13-stufige Synthese zugänglich sind. Ebenso können über diese Zwischenstufe die Vorläuferverbindungen für die jeweiligen Radiosynthesen synthetisiert werden. Der Vorteil des orthogonalen Schutzgruppensystems, auch den Alkylsubstituenten in der 1-Position beliebig variieren und so eine noch größere Anzahl an Derivaten ohne allzu großen Aufwand darstellen zu können, konnte auf den hier ausgetesteten Wegen jedoch nicht erreicht werden.

3.5 Radiosynthesen von [^{18}F]CBCPM und [^{18}F]CPMMCB

Mit den Verbindungen **60** und **61** standen nunmehr Vorläufer für die nukleophile Substitution mit n.c.a. [^{18}F]Fluorid zur Verfügung. Diese erfolgte in Gegenwart von Kryptofix[®] 2.2.2. in Anlehnung an Coenen *et al.* [22]. Die Radiosynthesen der Xanthinderivate [^{18}F]CBCPM (**66**) und [^{18}F]CPMMCB (**67**) gelang anschließend durch Entfernung der Pivaloyloxymethyl-Gruppe mit 2 N Natriumhydroxid-Lösung (Schema 41).



Schema 41: Radiosynthese von [¹⁸F]CBCPM und [¹⁸F]CPMMCB.

3.5.1 Optimierung der Markierungsreaktion

Zu Beginn der Radiosynthesen wurde die Markierung der Verbindung **60** zum radiofluorinierten Produkt **64** im Hinblick auf die optimale Reaktionstemperatur verbessert. Zusätzlich wurde die Zeitabhängigkeit dieser Reaktion bei den verwendeten Temperaturen untersucht. Die entsprechenden radiochemischen Ausbeuten sind der Tabelle 5 zu entnehmen, sowie in Abbildung 26 graphisch dargestellt.

Tabelle 5: Radiochemische Ausbeuten von **64** in Abhängigkeit von der Temperatur und der Zeit.

Zeit [Min]	Markierungsausbeute (64) [%]			
	80 °C	100 °C	120 °C	140 °C
5	22,1 ± 1,4	26,9 ± 0,7	30,1 ± 0,4	31,1 ± 0,8
10	23,6 ± 1,7	25,2 ± 0,3	25,8 ± 2,3	26,0 ± 1,1
15	25,2 ± 1,8	22,4 ± 0,5	22,6 ± 0,2	24,0 ± 0,4
20	25,6 ± 1,3	21,4 ± 0,2	20,8 ± 0,2	22,6 ± 0,5
25	25,7 ± 1,4	20,8 ± 0,8	19,1 ± 0,3	21,5 ± 0,4
30	25,0 ± 1,8	19,7 ± 0,7	17,6 ± 0,2	20,6 ± 0,2

n ≥ 3

Es ist zu erkennen, dass die radiochemische Ausbeute nach kurzer Zeit bei einer Temperatur von 140 °C mit 31,1 ± 0,8 % am größten ist. Mit zunehmender Reaktionszeit sinkt diese

jedoch stark, so dass nach 30 Minuten nur noch $20,6 \pm 0,2 \%$ Produkt vorhanden sind. Ähnlich verhält es sich bei Temperaturen von $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ bzw. $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, auch hier verringert sich die Ausbeute mit der Zeit deutlich. Eine Ausnahme stellt die Zeitabhängigkeit der Markierungsreaktion bei $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ dar. Hier werden zu Beginn mit $22,1 \pm 1,4 \%$ zwar deutlich geringere Mengen des gewünschten Markierungsprodukts **64** erhalten, mit der Zeit wird die Ausbeute jedoch stetig größer, so dass nach 30 Minuten bis zu $25,0 \pm 1,8 \%$ erzielt werden können. Dies liegt allerdings noch deutlich unter der Ausbeute der Reaktionen bei $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ nach einer Zeit von fünf Minuten.

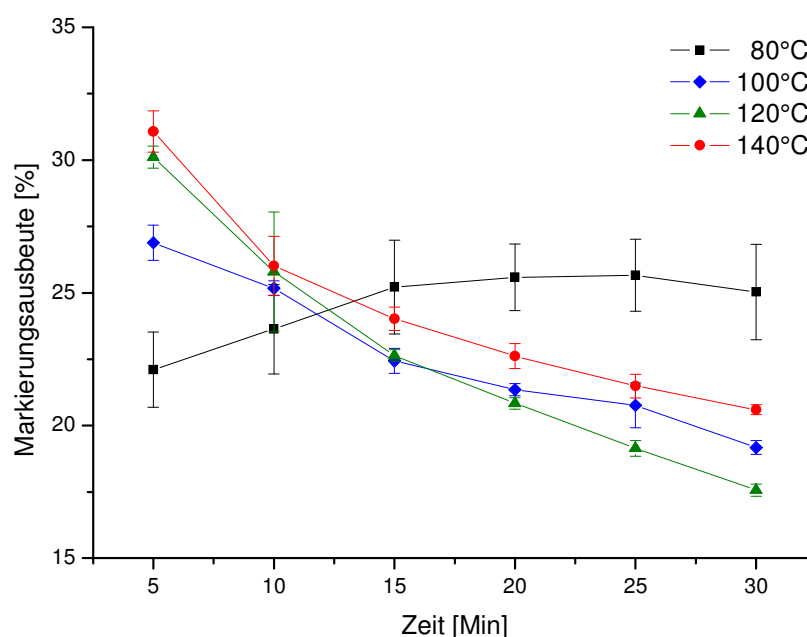


Abbildung 26: Radiochemische Ausbeuten mit Standardabweichungen von **64** in Abhängigkeit von der Temperatur und der Zeit.

Wie in Tabelle 6 sowie in Abbildung 27 zu erkennen, findet während der Radiofluorierung zum Markierungsprodukt **64** bereits eine Entschützung zum gewünschten Endprodukt [^{18}F]CBCPM (**66**) statt, welche mit steigender Temperatur bzw. Zeit stetig zunimmt. Dies erklärt die starke Abnahme der radiochemischen Ausbeuten von **64** bei den Temperaturen ab $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, da die Zeitabhängigkeit in Abbildung 29 nicht die reine Radiofluorierungsreaktion darstellt. Dieser Effekt ist bei $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ als Reaktionstemperatur nicht gegeben, da hier die Umsetzung zum entschützten [^{18}F]CBCPM (**66**) deutlich langsamer stattfindet und erst eine weitgehende Markierung mit [^{18}F]Fluorid erfolgt.

Tabelle 6: Radiochemische Ausbeuten von **66** sowie radiochemische Gesamtausbeute von **64** und **66** bei der Radiofluorierung mit n.c.a. [^{18}F] F^- .

Zeit [Min]	Produkt	Produktausbeute [%]			
		80 °C	100 °C	120 °C	140 °C
5	66	2,7 ± 0,3	4,0 ± 0,1	5,9 ± 0,1	15,4 ± 0,3
10		3,2 ± 0,4	6,6 ± 0,2	10,9 ± 1,1	19,5 ± 0,9
15		3,8 ± 0,4	8,6 ± 0,2	13,5 ± 0,2	19,9 ± 0,3
20		4,2 ± 0,3	10,3 ± 0,2	15,7 ± 0,3	21,0 ± 0,5
25		4,7 ± 0,4	12,1 ± 0,5	17,5 ± 0,2	21,2 ± 0,7
30		5,3 ± 0,8	13,2 ± 0,4	18,9 ± 0,4	22,5 ± 0,4
5	64 + 66	24,8 ± 1,7	30,9 ± 0,7	36,0 ± 0,5	46,5 ± 1,0
10		26,9 ± 2,0	31,8 ± 0,4	36,7 ± 3,4	45,5 ± 2,0
15		29,0 ± 2,2	31,0 ± 0,5	36,1 ± 0,3	43,9 ± 0,5
20		29,8 ± 1,5	31,6 ± 0,3	36,5 ± 0,3	43,6 ± 0,5
25		30,4 ± 1,7	32,9 ± 1,2	36,7 ± 0,3	42,7 ± 1,1
30		30,3 ± 2,6	32,4 ± 0,4	36,4 ± 0,6	43,1 ± 0,4

n ≥ 3

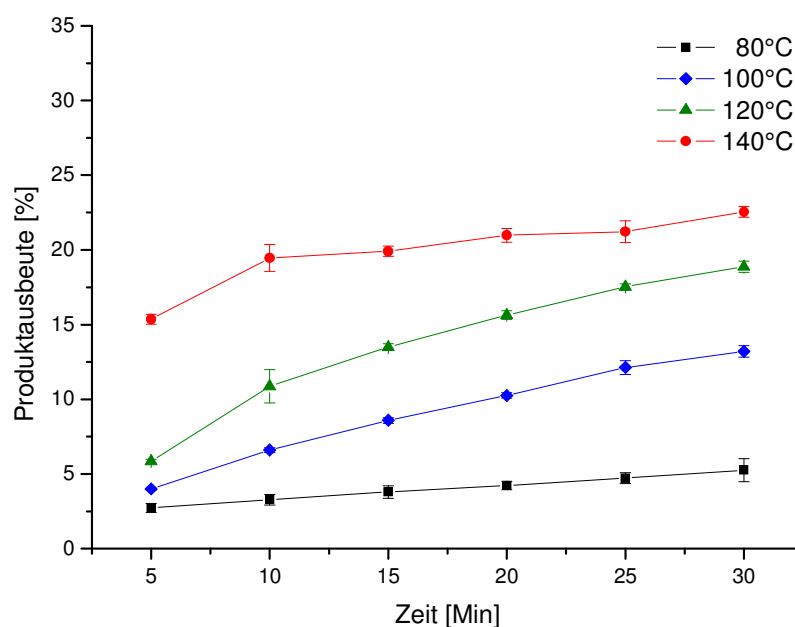


Abbildung 27: Radiochemische Ausbeuten und Standardabweichungen von **66** in Abhängigkeit von der Temperatur und der Zeit.

Abbildung 28 zeigt die radiochemische Gesamtausbeute der Markierungsreaktion, bestehend aus der gemessenen radiochemischen Ausbeute an **64** zuzüglich dem schon zum gewünschten Produkt **66** umgesetztem Teil. Diese sind ebenfalls der Tabelle 6 zu entnehmen. Während bei einer Temperatur von 80 °C noch eine Vergrößerung der Ausbeute mit der Zeit erreicht werden kann, nimmt diese bei einer Reaktionstemperatur von 140 °C langsam mit der Zeit ab. Dies spricht dafür, dass bei höheren Temperaturen eine langsame Zersetzung eines oder beider radiofluorierter Produkte zu anderen Nebenprodukten stattfindet, welche jedoch nicht näher untersucht wurden. Da bei einer Temperatur von 140 °C schon nach kurzer Zeit ein großer Umsatz zum entschützten Produkt **66** stattfindet, besitzt die Zersetzung zu den Nebenprodukten zu späteren Zeitpunkten mehr Gewicht und die Kurve fällt leicht ab. Bei niedrigeren Temperaturen wird das radiofluorierter Produkt **66** langsamer gebildet (vgl. Abbildung 27), so dass dessen Bildung der Zersetzung entgegenwirkt bzw. im Fall von 80 °C überwiegt und die Kurve zunächst weiter ansteigt, während die radiochemische Gesamtausbeute im betrachteten Zeitintervall bei Temperaturen von 100 °C bzw. 120 °C weitgehend konstant bleibt.

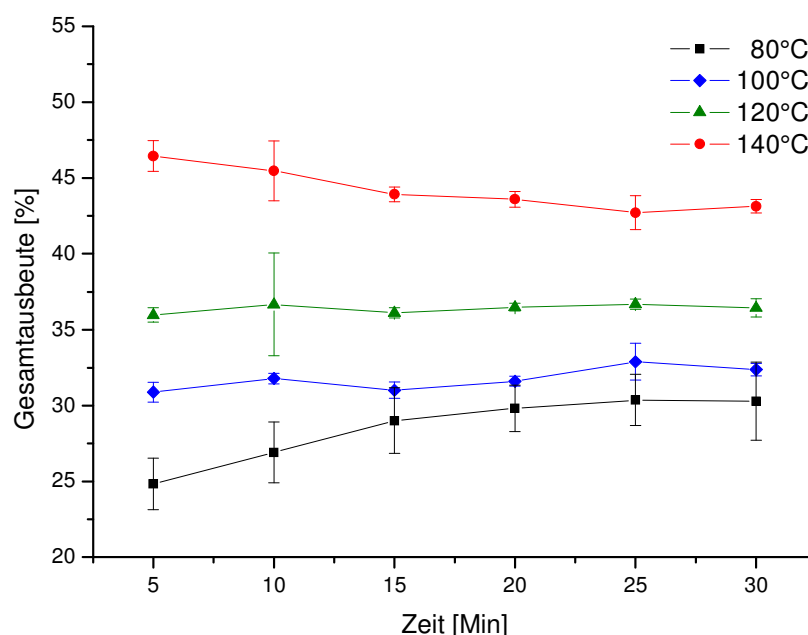


Abbildung 28: Radiochemische Gesamtausbeute und Standardabweichung von **64** und **66** (vgl. Schema 41) in Abhängigkeit von der Temperatur und der Zeit.

Die größte radiochemische Ausbeute an **64** und **66** konnte in diesen Versuchen bei einer Reaktionstemperatur von 140 °C und einer kurzen Reaktionszeit von nur fünf Minuten mit

46,5 ± 1,0 % erreicht werden. Daher wurden diese Parameter für die späteren Markierungsreaktionen der Vorläuferverbindungen **60** und **61** beibehalten. Bei der Markierung von **61** wurde unter diesen Bedingungen eine radiochemische Ausbeute von 28,7 ± 0,3 % an **65** bzw. zuzüglich dem bereits entschütztem Produkt [¹⁸F]CPMMCB (**67**) eine radiochemische Gesamtausbeute von 32,5 ± 0,3 % erhalten (n = 3).

Da die radiochemische Gesamtausbeute der Markierungsreaktion bei hohen Temperaturen nach kurzer Zeit am größten ist und sich mit der Zeit verringert, könnte eine Mikrowellengestützte Radiofluorierungsreaktion zu größeren radiochemischen Ausbeuten führen, da hier eine kurzzeitige hohe Energiezufuhr erfolgt und sich somit die Wahrscheinlichkeit der Zersetzung einer der beiden radiofluorierten Produkte möglicherweise verringert.

3.5.2 Entschützung zum [¹⁸F]CBCPM bzw. [¹⁸F]CPMMCB und molare Aktivität

Die Entschützung der beiden radiofluorierten Verbindungen **64** und **65** erfolgte quantitativ mit 2 N Natriumhydroxid-Lösung bei 140 °C in zwei Minuten. Nach erfolgter Festphasenextraktion wurden die Produkte **66** bzw. **67** sauber mittels HPLC abgetrennt und über den Zusatz der nicht radioaktiven Standards identifiziert (vgl. Abbildung 29 und 30). Es wurden radiochemische Gesamtausbeuten der Radiosynthese von 21,3 ± 3,8 % im Fall vom [¹⁸F]CBCPM sowie 14,4 ± 2,5 % bei [¹⁸F]CPMMCB erhalten. Die Syntheszeit beträgt für beide Verbindungen 30 Minuten. Zuzüglich der Zeit für die Abtrennung der markierten Produkte wurde **66** in einer Gesamtsyntheszeit von 92,5 ± 0,5 Minuten und das Produkt **67** in einer Zeit von 138,0 ± 1,0 Minuten isoliert erhalten. Da sich die radiochemischen Ausbeuten der Markierungsreaktionen durch die anschließenden basischen Hydrolysen in etwa halbieren, sind hier noch weitere Versuche durchzuführen, um einen Einfluss der Reaktionstemperatur oder der Zeit auf eine mögliche Zersetzung der Produkte zu untersuchen.

Abbildung 29 zeigt unten die HPLC-Diagramme der Abtrennung von **66** mittels HPLC als Aktivsignal (rot), UV-Signal (schwarz) und als UV-Signal unter Zugabe von **1** (blau). Die UV-Signale wurden hier bei einer Wellenlänge von λ = 275 nm aufgenommen. Es ist zu erkennen, dass das radiofluorierte [¹⁸F]CBCPM mit guter Ausbeute bei der Entschützung aus **64** dargestellt und gut abgetrennt werden kann. Es ist kein UV-Signal in diesem Bereich sichtbar und das radiofluorierte Produkt konnte durch den Trägerzusatz an **1** identifiziert werden. Zusätzlich sind in der Abbildung die HPLC-Diagramme nach Abtrennung des radioaktiven Produkts zur Qualitätskontrolle zu sehen (oben). Der Radioaktivkanal (violett) zeigt ausschließlich das zum Produkt gehörende Signal, auch im UV-Kanal (braun) sind

keine Verunreinigungen zu erkennen. Durch erneuten Trägerzusatz konnte durch das UV-Signal von **1** (grün) das [^{18}F]CBCPM als Produkt bestätigt werden. Die molare Aktivität von **66** wurde über die entsprechende Kalibrationskurve (vgl. Kapitel 4.5) aus Gleichung 1 (vgl. Kapitel 1.1) zu $A_S \geq 12,3 \pm 0,19 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ ($0,33 \pm 0,01 \text{ Ci}/\mu\text{mol}$) bestimmt.

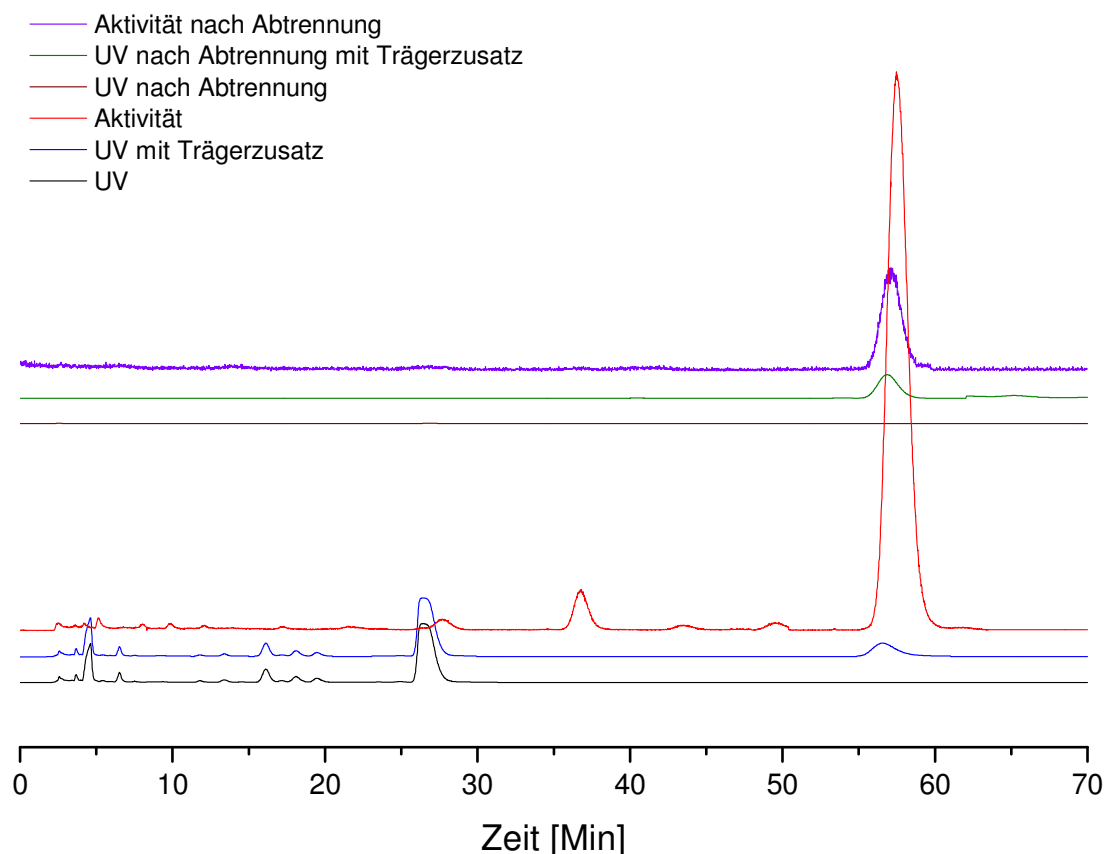


Abbildung 29: HPLC-Diagramme der Abtrennung von **66** bei (unten) sowie nach (oben) dessen Abtrennung mit Aktivsignal (rot; violett), UV-Signal (schwarz; braun) und UV-Signal unter Trägerzusatz (blau; grün) ($\lambda = 275 \text{ nm}$).

Die HPLC-Diagramme der Abtrennung von **67** sind in Abbildung 30 (unten) zu erkennen. Auch hier ist das Aktivsignal rot, das UV-Signal schwarz und das UV-Signal unter Zugabe von **2** als Träger blau dargestellt. Die UV-Signale wurden ebenfalls bei einer Wellenlänge von $\lambda = 275 \text{ nm}$ aufgenommen. Das radiofluorierte [^{18}F]CPMMCB konnte mit guter Ausbeute bei der Entschützung aus **65** dargestellt und gut abgetrennt werden. Ebenso ist kein UV-Signal in diesem Bereich sichtbar und das radiofluorierte Produkt konnte durch den Trägerzusatz an **2** identifiziert werden. Die HPLC-Diagramme zur Qualitätskontrolle nach Abtrennung des radioaktiven Produkts sind ebenfalls in der Abbildung zu sehen (oben). Der

Radioaktivkanal (violett) zeigt auch hier nur den Produktpeak, auch im UV-Kanal (braun) sind keine Verunreinigungen zu erkennen. Durch erneuten Trägerzusatz wurde über das UV-Signal von **2** (grün) das [^{18}F]CBCPM als Produkt bestätigt. Die molare Aktivität von **67** wurde ebenfalls über die entsprechende Kalibrationskurve bestimmt, sie beträgt $A_S = 36,5 \pm 1,1 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ ($0,99 \pm 0,03 \text{ Ci}/\mu\text{mol}$).

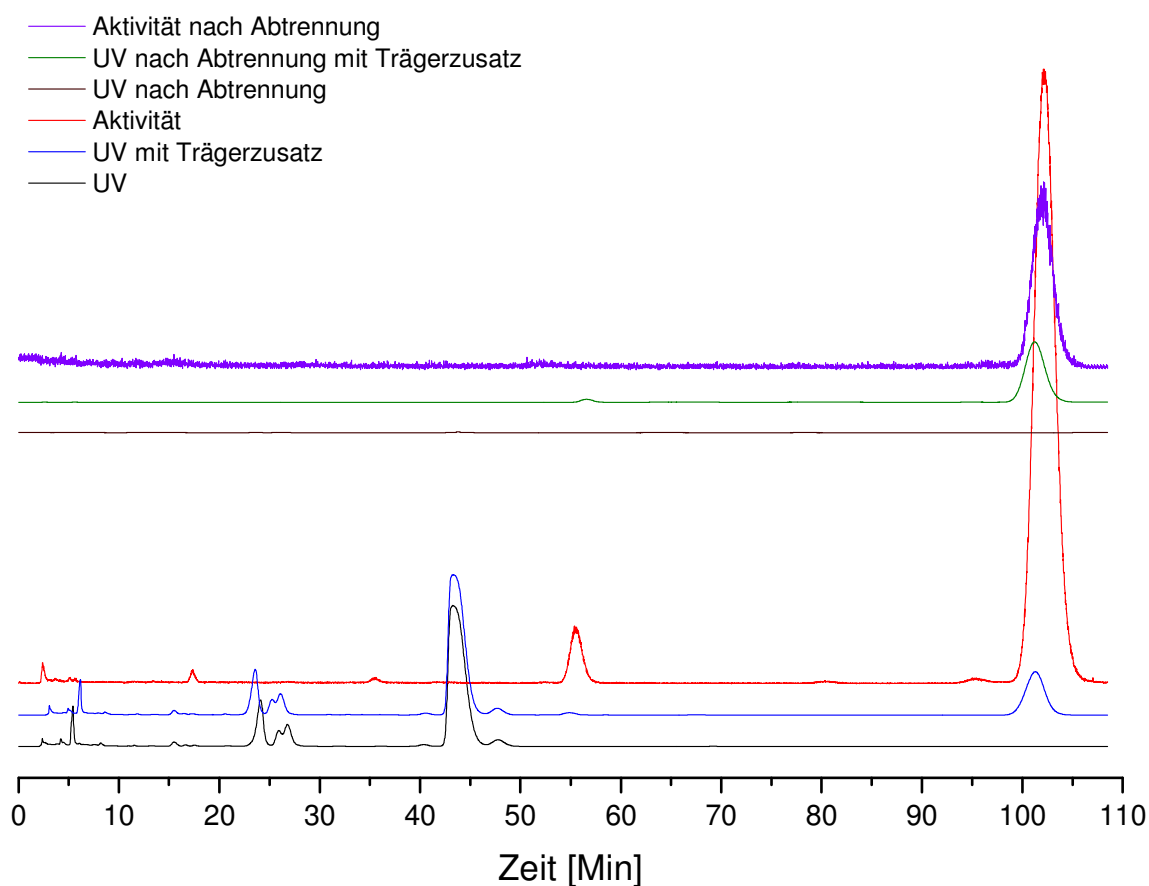


Abbildung 30: HPLC-Diagramme der Abtrennung von **67** bei (unten) sowie nach (oben) dessen Abtrennung mit Aktivsignal (rot; violett), UV-Signal (schwarz; braun) und UV-Signal unter Trägerzusatz (blau; grün) ($\lambda = 275 \text{ nm}$).

3.6 Präklinische Evaluierung von CBCPM und CPMMCB

Zur präklinischen Evaluierung der beiden Xanthinderivate CBCPM und CPMMCB wurden sowohl ihr Bindungsverhalten an den Adenosin A₁-Rezeptor im Hinblick auf Affinität und Selektivität als auch ihre metabolische Stabilität mit Hilfe von humanen Lebermikrosomen untersucht.

3.6.1 Untersuchung der Bindungseigenschaften in Kompetitionsassays

Über *in vitro* Kompetitionsassays wurden wie in Kap. 3.1.3 beschrieben die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten von **1** und **2** an Zellmembranen der CHO#38b-Zelllinie, welche den humanen Adenosin A₁-Rezeptor exprimiert, im Vergleich zu derjenigen von CPF PX bestimmt. Es wurde auch hier das [³H]DPCPX als radioaktiver Ligand verwendet, welcher durch die Xanthinderivate verdrängt wurde. Darüber konnten Aussagen über die Affinität dieser Verbindungen zum gewünschten Rezeptorsubtyp erhalten werden. Die entsprechenden Kompetitionskurven sind in den Abbildungen 31 und 32 dargestellt.

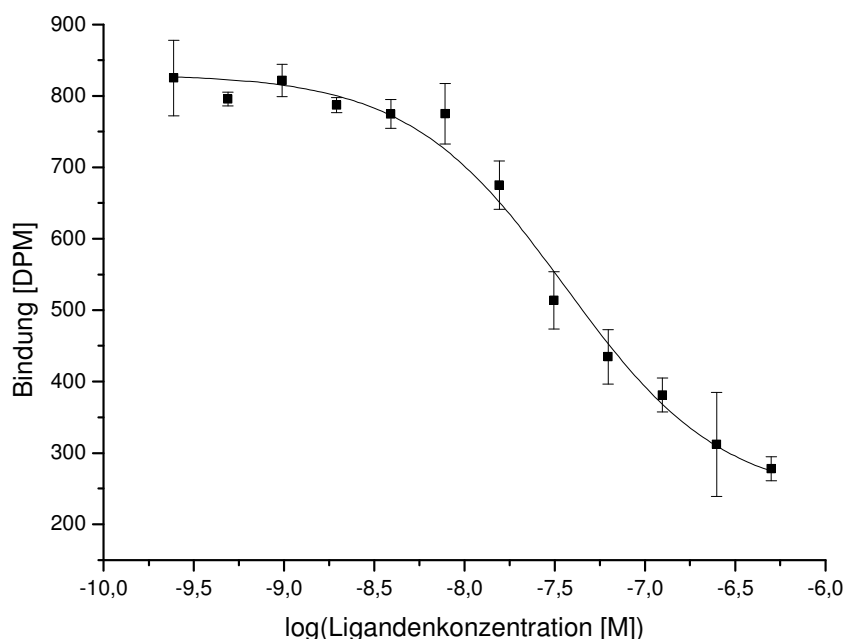


Abbildung 31: Kompetitionskurve des CBCPM mit [³H]DPCPX als Radioligand an A₁-Rezeptor exprimierenden Membranen von CHO#38b-Zellen.

Aus diesen Kurven lassen sich die entsprechenden K_i -Werte nach Cheng und Prusoff [73] bestimmen. Sie liegen bei $K_i = 15,5$ nM für das CBCPM (1) bzw. bei $K_i = 10,1$ nM für das CPMMCB (2). Somit besitzt das CPMMCB eine etwas höhere Affinität zum Adenosin A_1 -Rezeptor als das CPFPX ($K_i = 15,1$ nM, vgl. Kap. 3.1.3), die Affinität des CBCPM ist vergleichbar hoch. Es handelt sich demnach in beiden Fällen um höchst affine Liganden für den Adenosin A_1 -Rezeptor.

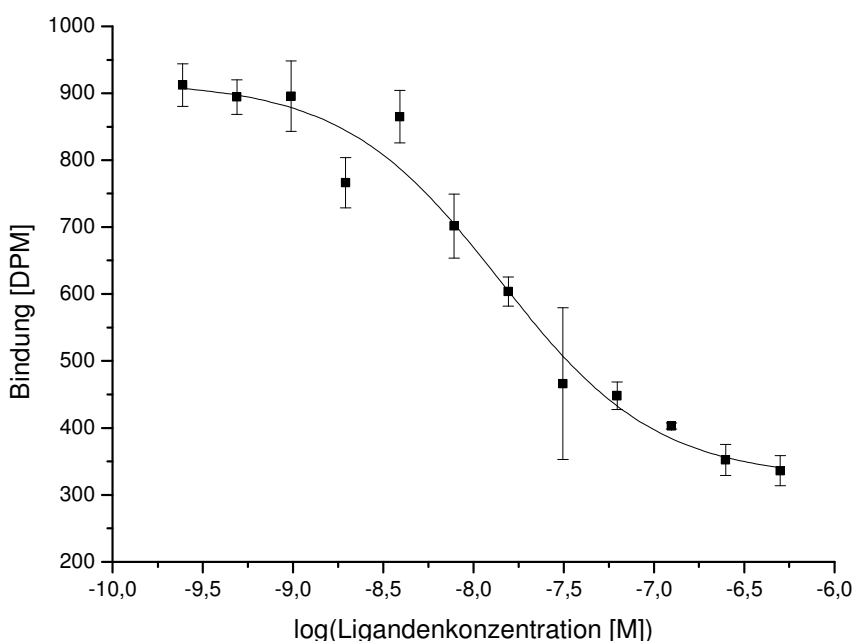


Abbildung 32: Kompetitionskurve des CPMMCB mit [^3H]DPCPX als Radioligand an A_1 -Rezeptor exprimierenden Membranen von CHO#38b-Zellen.

3.6.2 Autoradiographische Untersuchungen

Zur genaueren Analyse der Affinität sowie zur Bestimmung der Selektivität wurden autoradiographische *in vitro* Untersuchungen beider Verbindungen an horizontalen Rattenhirnschnitten durchgeführt. Zur Bestimmung der Totalbindung wurden jeweils vier der Schnitte in einer Pufferlösung, welcher eine Aktivität von etwa 50 kBq der radiofluorierten Verbindungen **66** bzw. **67** zugesetzt wurde, inkubiert. Die Konzentrationen der geträgerten radiofluorierten Verbindungen betrugen somit etwa 4,07 pM (**1**, **66**) bzw. 1,37 pM (**2**, **67**). Die Schnitte wurden gewaschen, auf Phosphor Imager Platten exponiert und an einem Phosphor Imager BAS-Reader ausgelesen. Zur Untersuchung der unspezifischen Aktivität wurde

neben den radioaktiven Verbindungen zusätzlich nicht radioaktives DPCPX in hoher Konzentration als höchst affiner und selektiver Adenosin A₁-Rezeptorligand zugegeben, um die Bindungsstellen der A₁-Rezeptoren zu blockieren. Die entsprechend erhaltenen Autoradiogramme sind in Abbildung 33 im Vergleich zu denen von [³H]DPCPX und [¹⁸F]CPFPX dargestellt.

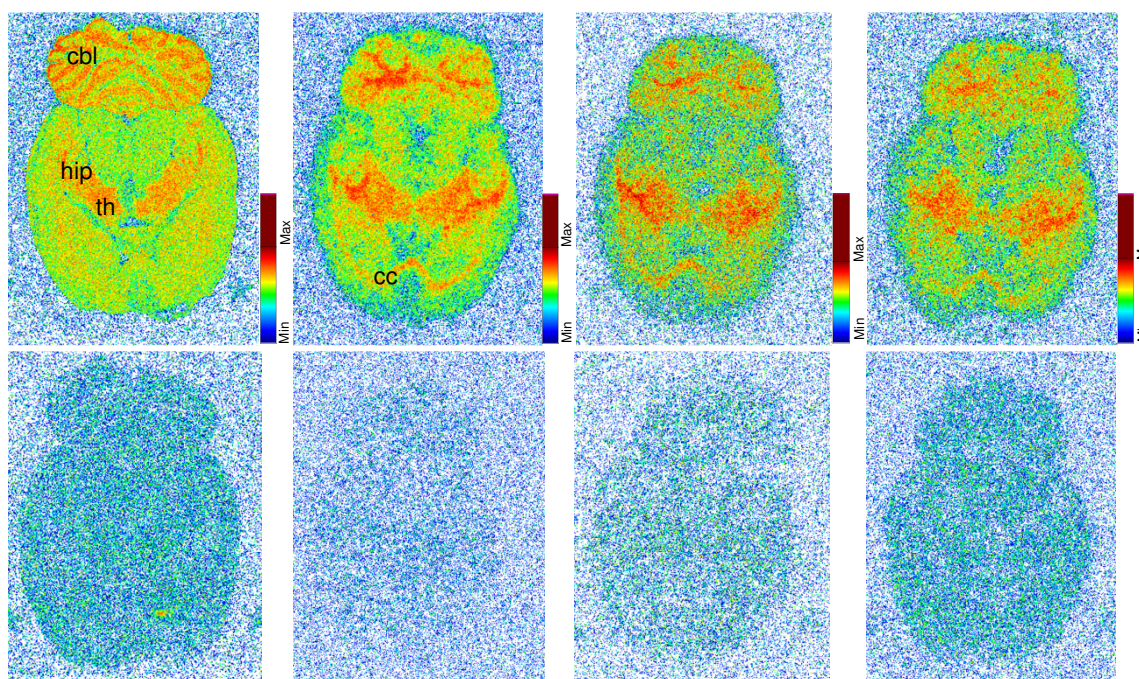


Abbildung 33: Darstellung der Totalbindung (oben) und der unspezifischen Bindung (unten) des [³H]DPCPX (links), [¹⁸F]CPFPX (Mitte links), [¹⁸F]CBCPM (Mitte rechts) und des [¹⁸F]CPMMCB (rechts).

Beide neue Verbindungen zeigen analog der beiden Referenzverbindungen in der Totalbindung eine deutliche und selektive Anreicherung der Aktivität im Hippocampus (hip), Thalamus (th), im Cerebellum (cbl) sowie im zerebralen Cortex (cc). Hierbei handelt es sich um Hirnregionen, in denen die Adenosin A₁-Rezeptoren stark exprimiert sind [55, 125, 126]. Dies verdeutlicht die gewünschte hohe Affinität der beiden Xanthinderivate zu dem interessierenden Rezeptor-Subtyp. Aufgrund der β^+ -Energie des Fluor-18 ist die Auflösung der Autoradiogramme von **66** und **67** sowie von [¹⁸F]CPFPX im Vergleich zu der des [³H]DPCPX mit Tritium als niederenergetischen β^- -Strahler deutlich geringer. Die fehlende Anreicherung von [³H]DPCPX im frontalen Cortex im Vergleich zu den radiofluorierten Verbindungen ist damit zu erklären, dass für die autoradiographische Untersuchung der tritiierten Verbindung andere Rattenhirnschnitte verwendet wurden. Des Weiteren besitzt das Gewebe im frontalen

Hirnbereich eine größere Dichte als das restliche Gewebe. Daher besteht die Möglichkeit, dass die Strahlung des [^3H]DPCPX in diesem Bereich vom Gewebe selbst absorbiert wird, während die Annihilationsstrahlung des Fluor-18 diese Gewebeschichten leicht durchdringen kann und von außen gut detektierbar ist.

Bei beiden neuen Xanthinderivaten findet eine sichtbare Verdrängung des Radioliganden von den Bindungsstellen durch das DPCPX statt. Die geringen unspezifischen Bindungen, in den Autoradiogrammen unten dargestellt, sprechen sowohl für hohe Selektivitäten zum Adenosin A_1 -Rezeptor, als auch für hohe molare Aktivitäten des [^{18}F]CBCPM und des [^{18}F]CPMMCB.

Die spezifischen Bindungen von **66** bzw. **67** sowie des [^{18}F]CPFPX wurden als Differenzen der Totalbindung und der unspezifischen Bindung bestimmt und sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Der Anteil der spezifischen Bindung ist in beiden Fällen sehr hoch, er beträgt 86,8 % im Fall des [^{18}F]CBCPM sowie 84,8 % beim [^{18}F]CPMMCB. Die spezifische Bindung des [^{18}F]CPFPX beträgt zum Vergleich 94,1 %.

Tabelle 7: Spezifische Bindung des Gesamthirns des [^{18}F]CBCPM, des [^{18}F]CPMMCB sowie des [^{18}F]CPFPX.

Verbindung	Totalbindung	Unspezifische Bindung	Spezifische Bindung
[^{18}F]CBCPM	2116,1 PSL	280,0 PSL	86,8 %
[^{18}F]CPMMCB	9442,3 PSL	1437,1 PSL	84,8 %
[^{18}F]CPFPX	3675,7 PSL	216,1 PSL	94,1 %

PSL = photostimulierbare Lumineszenz

3.6.3 Metabolismusstudien

Metabolismusstudien geben Aufschluss darüber, wie schnell eine Substanz im Körper durch die Lebermikrosomen abgebaut wird. Je langsamer der Metabolismus verläuft, desto größer ist die biologische Halbwertszeit der Verbindung im Körper. Da das CPFPX nur eine geringe biologische Halbwertszeit von etwa 10 Minuten im menschlichen Blutplasma besitzt [70], war es das Ziel dieser Arbeit, vergleichbar affine und selektive Xanthinderivate zu finden, welche länger im Körper stabil und damit für *in vivo* Untersuchungen des Adenosin A_1 -Rezeptors besser geeignet sind.

Daher wurden vergleichende *in vitro* Metabolismusstudien der nicht radioaktiv markierten Verbindungen CPFPX, CBCPM sowie CPMMCB durchgeführt, um Aussagen über den Abbau der neu dargestellten Xanthinderivate in der Leber zu erhalten. Die relativen Mengen der noch intakten Verbindungen wurden in Abhängigkeit von der Zeit über HPLC-Trennungen bestimmt und sind der Abbildung 34 zu entnehmen. In allen drei Fällen verläuft der Abbau der Substanzen annähernd exponentiell. Der mit der Zeit langsamere Metabolismus der Verbindungen könnte an dessen mit der Zeit geringeren Konzentrationen der getesteten Verbindungen in der Versuchsmischung liegen. Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl das CBCPM, als auch das CPMMCB einen deutlich langsameren Metabolismus besitzen als das CPFPX. Bereits nach 30 Minuten sind nur noch etwa $40,0 \pm 1,7\%$ des ursprünglich vorhandenen CPFPX vorhanden, nach 60 Minuten nur noch $21,8 \pm 2,3\%$ ($n = 3$). Beim CPMMCB sind zu diesen Zeitpunkten noch $58,3 \pm 13,7\%$ bzw. $31,6 \pm 3,1\%$, beim CBCPM sogar $66,0 \pm 2,9\%$ bzw. $44,7 \pm 3,7\%$ vorhanden ($n = 3$). Dieser Trend setzt sich weiter fort, der Abstand zwischen den relativen Mengen der verschiedenen Verbindungen wird mit der Zeit stetig größer.

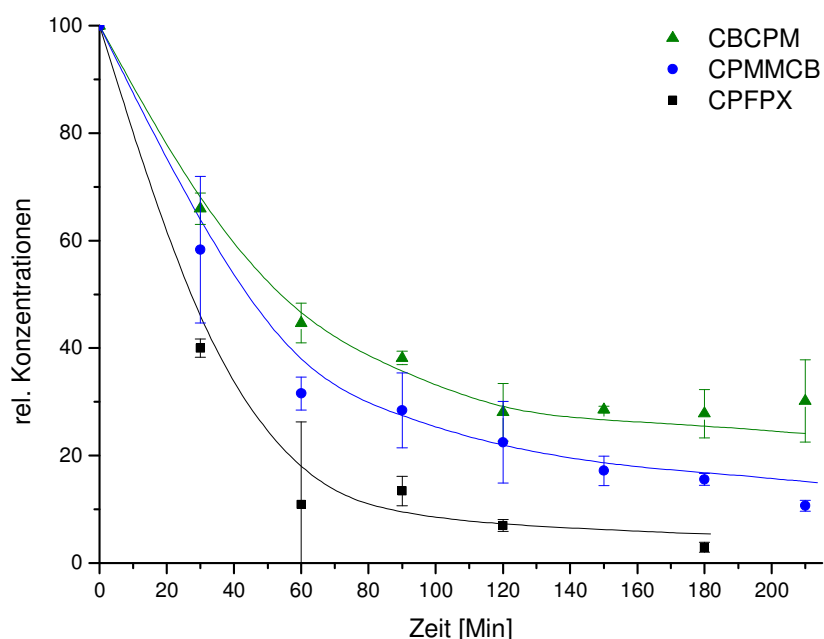


Abbildung 34: Abbau von CPFPX, CBCPM und CPMMCB durch humane Lebermikrosomen.

Somit ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen, mit CBCPM und CPMMCB zwei Derivate des CPFPX darzustellen, welche in radiofluorierter Form vielversprechende Radioliganden des Adenosin A₁-Rezeptors für die *in vivo* Bildgebung unter Anwendung der Positronen-

Emissions-Tomographie darstellen. Beide Verbindungen binden mindestens so affin und selektiv an den gewünschten Rezeptor-Subtyp wie die etablierte Referenzverbindung [^{18}F]CPFPX und besitzen zudem deutlich verbesserte metabolische Eigenschaften *in vitro*. Es stehen jedoch noch weitergehende präklinische Untersuchungen aus, um Aussagen zur biologischen Halbwertszeit dieser Verbindungen *in vivo* treffen zu können.

4 Experimenteller Teil

4.1 Verwendete Chemikalien und Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien und trockenen Lösungsmittel von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) oder Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um Wildtyp-Zellen, welche von der Firma HPA Culture Collections (Salisbury, United Kingdom) bezogen wurden, sowie um im Haus genetisch veränderte Zelllinien, welche für die Arbeit zur Verfügung gestellt wurden. Alle Arbeiten an den Zellen erfolgten bis zur Zellernte unter einer Sterilbank der Firma BDK Luft- und Raumfahrttechnik GmbH (Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland).

Für die Optimierung und Durchführung der Bindungsstudien wurden als Matrix für die Zellmembranen Gel-Fix® für Agarose-Platten der Firma SERVA Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland) verwendet.

Die für die Bindungsstudien verwendeten Xanthinderivate wurden selbst oder im Haus synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

Das [³H]8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin wurde von der Firma American Radio-labeled Chemicals (St. Louis, USA) bezogen.

Die Bestimmungen der Tritiumradioaktivitäten erfolgte mit Ultima Gold™ Szintillator-Lösung der Firma Perkin-Elmer (Waltham, USA) an einem Bohrloch-Detektor (Tri-Carb 2300TR) der Firma Packard (Dreieich, Deutschland).

Lumineszenzbestimmungen bei den Versuchen zu den funktionellen Assays wurden mit einem Luminometer des GloMax®-Multi+ Detektionssystems der Firma Promega (Madison, USA) durchgeführt.

Die Reinigung der Rohprodukte mittels Säulenchromatographie erfolgte an Silicagel unter Verwendung eines Reveleris Flash Chromatographiesystem der Firma Grace (Breda, Niederlande).

Die massenspektrometrischen Daten wurden mittels Elektronensprayionisation (ESI) an einem Surveyor MSQ (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) mit einer Elektronenstrahlenergie von 70 eV erhalten.

Die ^1H -, ^{13}C - und ^{19}F -NMR-Spektren wurden entsprechend bei 200,13, 50,32 und 188,31 MHz mit einem Bruker DPX Avance 200 Spektrometer (Bruker Bio Spin GmbH, Rheinstetten, Deutschland) in deuteriertem Chloroform (CDCl_3) oder deuteriertem Dimethylsulfoxid (DMSO-d_6) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm relativ zu den Lösungsmittelsignalen angegeben. Für die Signalmultiplizitäten werden folgende Abkürzungen verwendet: s, Singulett; d, Dublett; t, Triplett; q, Quartett; m, Multiplett; br, breit. Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz angegeben. ^{13}C -NMR Spektren wurden unter ^1H -Breitband Entkopplung (CPD) aufgenommen.

Alle Schmelzpunkte wurden mit einem Melting Point B-540 Instrument der Firma Büchi Labortechnik (Flawil, Schweiz) in offenen Kapillaren bestimmt.

Die Aufnahme der UV-Spektren erfolgte mit einem UV-1601 UV-Spektrometer der Firma Shimadzu (Duisburg, Deutschland).

Die für die Kartuschenabtrennungen benötigten SepPak C18 Plus-Kartuschen wurden von Waters (Eschborn, Deutschland) bezogen.

Radioaktivitätsmessungen wurden mit einem CRC[®]-25R der Firma Capintec Inc. (Ney Jersey, USA) durchgeführt.

Die radiodünnschichtchromatographischen Analysen erfolgten auf mit Kieselgel beschichteten Folien (Polygram SIL G/UV₂₅₄ der Firma Macherey & Nagel (Düren, Deutschland)), welche mit einem Instant IMAGER der Firma Packard (Dreieich, Deutschland) ausgelesen wurden.

Die HPLC-Analysen wurden mit einer L-6000 Pumpe und einem K-2501 UV Detektor der Firma Merck Hitachi (Darmstadt, Deutschland), sowie einem 925-SCINT Photomultiplier Base mit ACE Mate Signalverstärker und NaI(Tl)-Detektorkristall zur Radioaktivitätsmessung der Firma Knauer und EG&G Ortec (Oak Ridge, USA) auf einer Kromasil 100,5-C-18 Säule (250 x 4,6 mm) von CS-Chromatographie Service GmbH (Langerwehe, Deutschland) durchgeführt. Die Aufnahme der UV-Signale erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 275 \text{ nm}$.

Die Auswertung der autoradiographischen Studien erfolgte über Phosphor Imager Platten an einem Phosphor Imager BAS 500 der Firma Fujifilm (Tokyo, Japan) und zugehöriger Imager-Software.

Die humanen Lebermikrosomen für die Metabolismusstudien wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

Alle Reaktionen fanden, sofern nicht anders angegeben, unter magnetischem Rühren in Glasrundkolben entsprechender Größe statt. Bei den eingesetzten Lösungen handelt es sich, falls nicht anders angegeben, um wässrige Lösungen.

4.2 Bindungsstudien an humanen Adenosin A₁-Rezeptoren

Nach einem im Haus etablierten Verfahren wurden Verdrängungsstudien durchgeführt, bei denen ein tritiiertes Ligand mit bekanntem K_D -Wert, in diesem Fall [³H]DPCPX, durch die zu testenden Substanzen in Konkurrenz eingesetzt wurde.

4.2.1 Vorbereitung der Zellmembranen

Vor der Durchführung der Kompetitionsassays mussten die hierfür verwendeten Zellen kultiviert und aufgearbeitet werden, um anschließend die Zellmembranen als Pellet zu erhalten.

Auftauen der Zelllinie

Für die Kompetitionsversuche wurde die im Haus genetisch veränderte CHO#38b-Zelllinie verwendet. Hierbei handelt es sich um eine CHO-K1-Zelllinie, welche den Adenosin A₁-Rezeptor exprimiert. Zunächst musste das nötige Zellmedium vorbereitet werden, um die gewünschten CHO#38b-Zellen in Kultur bringen zu können. Dieses bestand aus 500 mL F-12 NUT Mix, 50 mL fetalem Kälberserum (FCS), 5 mL einer Lösung, welche Antibiotika und Antimykotika enthält (Anti-Anti), 5 mL einer Lösung aus nichtessentiellen Aminosäuren (MEM NEAA) sowie 5 mL Geneticin (G-418; 80 mg/mL), welches der Selektion genetisch veränderter Zelllinien dient.

Anschließend wurden 8 mL dieses Mediums in eine 9 mL fassende Petrischale gegeben. Die mit 500 µL Dimethylsulfoxid in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Zellen der gewünschten Zelllinie wurden aufgetaut und ebenfalls in die Petrischale gegeben. Der Kühlbehälter wurde mit 500 µL des Mediums nachgespült, anschließend wurde das Medium zu den übrigen Zellen hinzugegeben.

Vermehrung der Zellen

Sobald der Boden der Petrischale mit den Zellen fast vollständig bedeckt war, wurde zum Weiterführen der Zelllinie das Medium mit Hilfe einer Membranpumpe entfernt und einmal mit 5 mL PBS, welches anschließend wieder entfernt wurde, gewaschen. Dann wurden 500 µL Trypsin auf die Zellen gegeben und etwa drei Minuten mit Hilfe einer Wärmplatte auf 37 °C erhitzt. Das so erfolgte Ablösen der Zellen von dem Untergrund wurde mit 8,5 mL Medium gestoppt und die Zellen darin suspendiert. Anschließend wurde jeweils ein Teil der Zellen enthaltenen Lösung in neue Petrischalen zu frischem Medium gegeben, um insgesamt 40 Schalen zu füllen.

Zellernte

Zur Ernte der Zellen wurde das Medium aus den Petrischalen abgesaugt, die Zellen einmal mit 5 mL PBS gewaschen und dieses im nächsten Schritt wieder entfernt. In jede Petrischale wurde 1 mL PBS gegeben und die Zellen mit Hilfe eines Gummi-Schabers vorsichtig suspendiert. Die Zellsuspensionen wurden in einem 50 mL fassenden Falcongefäß gesammelt. Für die spätere Proteinbestimmung wurde mit einer Micropipette ein Milliliter entnommen und in ein Eppendorfial überführt. Sowohl das Falcongefäß, als auch das Eppendorfial wurden für 10 Minuten bei 1500 x g zentrifugiert, anschließend wurde aus beiden Gefäßen das überstehende PBS abgesaugt. Die Zellpellets in dem Falcongefäß und dem Eppendorfial wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur späteren Bestimmung des Proteingewichts musste das Volumen des Zellen enthaltenen PBS in dem Falcongefäß bestimmt werden. Hierzu wurde dieses zunächst leer (Tara-Gewicht) und anschließend zusammen mit der Zellsuspension nach Entnahme des Volumens für die Proteinbestimmung gewogen. Die Differenz der Massen wurde dem Volumen der enthaltenen Suspension gleichgestellt.

Das Frischgewicht der Zellen wurde bestimmt, indem das Falcongefäß mit den Zellpellet nach Entfernung des PBS gewogen und hiervon die Tara-Masse abgezogen wurde.

Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinmenge in dem Zellpellet wurden zunächst Standards hergestellt. Hierzu wurden etwa 4 mg Humanserumalbumin in einem 1,5 mL Reaktionsvial eingewogen. Anschließend wurde 1 mL Proteinlösungsmittel (PLM), bestehend aus einer wässrigen Lösung aus 2 % Natriumdodecylsulfat und 12 % Ammoniumhydroxid, zugefügt und das

Protein vorsichtig zur Erstellung der Stammlösung gelöst. Es wurde eine Verdünnungsreihe mit vier weiteren Lösungen hergestellt, welche sich durch jeweilige 1:1-Verdünnungen ergaben.

Das in dem Eppendorfvial befindliche eingefrorene Zellpellet aus der Zellernte wurde auf Eis gestellt und auftauen gelassen. Anschließend wurden 500 µL Lysepuffer, bestehend aus einer wässrigen Lösung mit 5 mM Trizma® und 2 mM EDTA, zugegeben und das Pellet vorsichtig resuspendiert. Danach wurde die Zelllösung mit einem Homogenisator zerkleinert und so die Zellstruktur zerstört. Hierbei wurde kontinuierlich mit Eis gekühlt. Das Homogenat wurde bei 4 °C für 10 Minuten mit 1500 x g zentrifugiert. Der Bodensatz wurde verworfen, während der Überstand, welcher die Zellmembranen beinhaltete, für 60 Minuten bei 50.000 x g zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde entfernt und das entstandene Pellet mit 100 µL PLM vorsichtig gelöst.

Mit einer Präzisionspipette wurden jeweils drei Mal 2 µL Proteinlösung der Probe sowie der fünf Standards auf eine Celluloseacetatfolie pipettiert und diese an der Luft trocknen gelassen. Im Anschluss wurde die Folie für fünf Minuten unter Bewegung mit einer Amidoschwarzfärbelösung (100 mg Amidoschwarz in 100 mL Methanol – Eisessig – Wasser (3/1/6, v/v/v)) gefärbt. Daraufhin wurde ebenfalls unter Bewegung drei Mal jeweils fünf Minuten mit einer Entfärbelösung (Methanol – Eisessig – Wasser (3/1/6, v/v/v)) gewaschen und die Folie an der Luft trocknen gelassen.

Die einzelnen Farbspots wurden ausgeschnitten und in Eppendorfvials überführt. Es wurden jeweils 600 µL konzentrierte Essigsäure zugefügt und die Vials zum Lösen der Membranen für fünf Minuten geschüttelt. Nach Überführung von jeweils 500 µL dieser Lösungen in Mikroküvetten wurden die Proben im Photometer bei 650 nm gegen Wasser als Blindprobe gemessen. Über die Eichgerade der mitgemessenen Proteinstandards wurde die Proteinkonzentration in der Probe bestimmt. Das Gesamtproteingewicht des nach der Zellernte in dem Falcongefäß befindlichen Zellpellets wurde berechnet, indem die Proteinkonzentration mit dem Verhältnis zum vorher bestimmten Volumen der Zellsuspension multipliziert wurde.

Membranaufarbeitung

Das nach der Zellernte in dem Falcongefäß befindliche Zellpellet wurde auf Eis gestellt und aufgetaut. Anschließend wurden pro 100 mg Frischgewicht 800 µL Lysepuffer zugegeben und das Pellet vorsichtig resuspendiert. Die Zelllösung wurde mit einem Homogenisator zerkleinert und so die Zellstruktur zerstört. Hierbei wurde durchgehend mit Eis gekühlt. Das Homogenat wurde zu gleichen Volumina in Eppendorfvials überführt und in diesen bei 4 °C

für 10 Minuten bei 1500 x g zentrifugiert. Der Bodensatz wurde verworfen, der Überstand wie oben für 60 Minuten bei 50.000 x g zentrifugiert. Das in den einzelnen Eppendorfvials befindliche Proteingewicht wurde bestimmt. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellmembranpellets in Assaypuffer, bestehend aus einer wässrigen 50 mM Trizma®-Lösung, resuspendiert. Hierbei wurde jeweils so viel Pufferlösung zugegeben, dass die Proteinkonzentration in jedem Vial 8 mg/mL bzw. zur Bestimmung der für den Kompetitionsassay nötigen Proteinmenge 6 oder 4 mg/mL betrug. Die Membransuspensionen wurden zusammengeführt und anschließend in Portionen zu je 80 µL bzw. 100 µL für die spätere Verwendung bei -80 °C eingefroren.

4.2.2 Optimierung der Parameter der Kompetitionsassays

Bestimmung der nötigen Proteinmenge pro Spot

Zur Bestimmung der für die Kompetitionsassays jeweils nötigen Proteinmenge wurden die in Portionen eingefrorenen Membransuspension verschiedener Konzentrationen in einem 37 °C warmen Trockenschrank aufgetaut. Anschließend wurde das gleiche Volumen einer 2,5 %-igen Agaroselösung in Assaypuffer zugefügt und gut vermischt. Mit Hilfe einer Multipette wurden auf 18 Agarose-Streifen jeweils drei Portionen (Spots) zu je 5 µL der Membran-Agarose-Suspension aufgetragen und für 24 Stunden im Kühlschrank getrocknet. Zur Variation der Proteinmenge pro Spot wurden verschiedene Konzentrationen zwischen 4 und 8 mg/mL an Membransuspensionen verwendet (vgl. Tabelle 2, Kapitel 3.1.1).

Es wurden 18 je 2,0 mL fassende Eppendorfvials bereitgestellt und nummeriert. In Vial 1 - 9 wurden jeweils 1400 µL Assaypuffer, in die Gefäße 10 - 18 je 1300 µL des Puffers gegeben. In jedes Eppendorfvial wurden 100 µL einer vorher hergestellten [³H]DPCPX-Lösung gefüllt, so dass dessen Endkonzentration in den Vials zu Beginn des Assays 1 nM betrug. In die Vials 10 – 18 wurden zusätzlich je 100 µL zuvor bereitgestellter nicht radioaktiver DPCPX-Lösung gegeben, dessen Endkonzentrationen in den Gefäßen dann 1 µmol/L betrug. Anschließend wurden die vorbereiteten Membran-Agarose-Gelstreifen in die Eppendorfgefäße gegeben und 30 Minuten auf einem Vortexer bei niedriger Geschwindigkeit inkubiert. Die Gelstreifen wurden für 45 Sekunden in einem bewegten Wasserbad gespült, zerschnitten und jeweils ein Spot in ein mit 3,5 mL Szintillator-Lösung befülltes Plastikgefäß gegeben. Mit Hilfe eines Flüssigszintillationsdetektors wurden die Tritiumradioaktivitäten in den Behältern und somit die Menge des auf den Spots haftenden [³H]DPCPX bestimmt.

Bestimmung der Inkubationszeit bis zur Gleichgewichtseinstellung

Zur Bestimmung der für die Kompetitionsassays nötigen Inkubationszeit bis zur Gleichgewichtseinstellung der beiden Liganden an den Rezeptor-Bindungsstellen wurden wie oben beschrieben jeweils drei Membran-Agarose-Spots auf insgesamt 30 Agarose-Streifen aufgetragen und für 24 Stunden im Kühlschrank getrocknet. Dabei wurde eine Membrankonzentration von 8 mg/mL entsprechend einer Proteinmenge von 20 µg pro Spot verwendet.

In 30 2,0 mL fassende Eppendorfvials wurden jeweils 1300 µL Assaypuffer sowie 100 µL einer DPCPX-Lösung gegeben (Endkonzentration des DPCPX im Vial: 0,5 nM bzw. 1 µM). Anschließend wurden 100 µL einer [³H]DPCPX-Lösung zugefügt, so dass die Endkonzentration 1 nM betrug. Die vorbereiteten Membran-Agarose-Gelstreifen wurden in die Eppendorfgläser gegeben und zwischen 5 und 50 Minuten auf einem Vortexer (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York, USA) auf Stufe 1 bei niedriger Geschwindigkeit inkubiert. Die Gelstreifen wurden anschließend für 45 Sekunden in einem bewegten Wasserbad gespült, zerschnitten und jeweils ein Spot in ein mit 3,5 mL Szintillator-Lösung gefülltes Plastikgefäß gegeben, um die Tritiumradioaktivitäten über einen Flüssigszintillationsdetektor zu bestimmen.

Bestimmung der Abwaschzeit

Zur Bestimmung der für die Kompetitionsassays nötigen Abwaschzeit des nicht an den Membranen gebundenen [³H]DPCPX von den Gelstreifen wurden wie oben beschrieben jeweils drei Membran-Agarose-Spots auf insgesamt 30 Agarose-Streifen aufgetragen und für 24 Stunden im Kühlschrank getrocknet. Dabei wurde eine Membrankonzentration von 8 mg/mL entsprechend einer Proteinmenge von 20 µg pro Spot verwendet.

In 30 2,0 mL fassende Eppendorfvials wurden jeweils 1400 µL Assaypuffer sowie 100 µL einer [³H]DPCPX-Lösung zugegeben, die Endkonzentration des [³H]DPCPX im Vial betrug hier 1 nmol/L. Die vorbereiteten Membran-Agarose-Gelstreifen wurden in die Eppendorfgläser gegeben und 35 Minuten auf einem Vortexer bei niedriger Geschwindigkeit inkubiert. Anschließend wurden die Gelstreifen unterschiedlich lange zwischen 1 und 90 Sekunden in einem bewegten Wasserbad gespült. Die Gelstreifen wurden zerschnitten und jeweils ein Spot in ein mit 3,5 mL Szintillator-Lösung gefülltes Plastikgefäß gegeben, um die Tritiumradioaktivitäten des auf den Spots haftenden [³H]DPCPX zu bestimmen.

4.2.3 Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten des [³H]DPCPX

Zur Bestimmung des K_D-Wertes des Radioliganden für die verwendete Zelllinie wurden wie oben beschrieben jeweils drei Membran-Agarose-Spots auf insgesamt 16 Agarose-Streifen aufgetragen und für 24 Stunden im Kühlschrank getrocknet. Dabei wurde eine Membrankonzentration von 8 mg/mL entsprechend einer Proteinmenge von 20 µg pro Spot verwendet.

In acht 2,0 mL fassende Eppendorfvials (1-8) wurden jeweils 1300 µL Assaypuffer sowie 100 µL einer CPFPX-Lösung gegeben. Die Endkonzentration des nicht radioaktiven Liganden im Assay betrug somit 1 µM. In weitere acht Eppendorfgefäße (9-16) wurden jeweils 1400 µL Assaypuffer gegeben. Anschließend wurden in alle Gefäße je 100 µL von [³H]DPCPX-Lösungen verschiedener Konzentrationen hinzugefügt. Die jeweiligen enthaltenen Endkonzentrationen an tritiiertem Liganden im Assay sind Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Endkonzentrationen des [³H]DPCPX zur Bestimmung des K_D-Wertes.

Vial	[³ H]DPCPX
1, 9	10 nM
2, 10	8 nM
3, 11	6 nM
4, 12	4 nM
5, 13	2 nM
6, 14	1 nM
7, 15	0,5 nM
8, 16	0,25 nM

Die vorbereiteten Membran-Agarose-Gelstreifen wurden in die Eppendorfgefäße gegeben und für 40 Minuten auf einem Vortexer bei niedriger Geschwindigkeit inkubiert. Anschließend wurden die Gelstreifen für 60 Sekunden in einem bewegten Wasserbad gespült, zerteilt und jeweils ein Spot in ein mit 3,5 mL Szintillator-Lösung gefülltes Plastikgefäß gegeben. Mit Hilfe eines Flüssigszintillationsdetektors wurden die Tritiumaktivitäten berechnet.

Der K_D-Wert des Radioliganden konnte anschließend mit Hilfe des Programms GraphPad Prism, Version 4.00 für Windows der Firma GraphPad Software (La Jolla, USA) bestimmt werden.

4.2.4 Durchführung der Kompetitionsassays

Zur Bestimmung der K_i -Werte der im Haus bzw. selbst synthetisierten Xanthinderivate wurden wie bereits beschrieben jeweils drei Membran-Agarose-Spots auf insgesamt zwölf Agarose-Streifen aufgetragen und für 24 Stunden im Kühlschrank getrocknet. Dabei wurde eine Membrankonzentration von 8 mg/mL entsprechend einer Proteinmenge von 20 μ L pro Spot verwendet.

Von den zu untersuchenden Substanzen wurden Verdünnungsreihen mit Assaypuffer erstellt, so dass diese jeweils in zwölf verschiedenen Konzentrationen vorlagen. Die Konzentrationen wurden hierbei so gewählt, dass die Endkonzentration der ersten Probe im Kompetitionsassay 500 nM, die der letzten Probe 0,24 nM betrug.

In zwölf 2,0 mL fassende Eppendorfvials wurden jeweils 1300 μ L Assaypuffer sowie 100 μ L der verschieden konzentrierten Lösungen der einzelnen Xanthinderivate gefüllt. Anschließend wurden 100 μ L einer [3 H]DPCPX-Lösung zugegeben (Endkonzentration im Assay: 1 nmol/L). Die vorbereiteten Membran-Agarose-Gelstreifen wurden in die Eppendorfgelgefäße gegeben und für 40 Minuten auf einem Vortexer bei niedriger Geschwindigkeit inkubiert. Die Gelstreifen wurden für 60 Sekunden in einem bewegten Wasserbad gespült, zerschnitten und jeweils ein Spot in ein mit 3,5 mL Szintillator-Lösung gefülltes Plastikgefäß gegeben, um die Tritiumaktivitäten über den Szintillationszähler zu bestimmen.

Die K_i -Werte der Xanthinderivate konnte anschließend mit Hilfe des Programms GraphPad Prism, Version 4.00 für Windows der Firma GraphPad Software (La Jolla, USA) berechnet werden.

4.3 Validierung und Durchführung eines cAMP-Glo™ Assays

Die Untersuchungen zu den Funktionalitäten oben genannter Xanthinderivate wurden mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits der Firma Promega über den cAMP-Glo™ Assay durchgeführt.

Die Validierung des cAMP-Glo™ Assays für Agonisten erfolgte mit Zellen der PC-12- (A_{2A} -Rezeptoren), CHO WT-, CHOB#19- (A_{2A}), CHO#38b- (A_1), CHO#19- (A_1), sowie der CHOT3#3-Zelllinie (A_1), welche wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben kultiviert wurden. Bei Verwendung der CHO WT- und der PC-12-Zelllinie wurde kein G-418 im Zellmedium eingesetzt.

Da die im Kit vorhandenen Reagenzien bei -20 °C aufbewahrt werden müssen, wurden zunächst das Kinase-Glo® Substrat, der Kinase-Glo® Puffer, der cAMP-Glo™ Lysepuffer und der cAMP-Glo™ Reaktionspuffer bei Raumtemperatur auftauen gelassen.

In der Zwischenzeit wurde eine Verdünnungsreihe mit insgesamt zwölf verschiedenen Konzentrationen der jeweils zu testenden Substanz in PBS erstellt. Die Anfangskonzentrationen dieser Verbindungen im Assay variierten während der Validierung, sie lagen zwischen 200 nM und 2500 µM. Bei Untersuchungen von Antagonisten als Testsubstanz wurde zusätzlich eine Lösung eines zusätzlichen Agonisten angesetzt. In den verschiedenen Optimierungsversuchen variierten dessen Konzentrationen im Assay zwischen 1,25 nM und 250 µM.

Zur Untersuchung der Wirkung der Testsubstanz auf die cAMP-Produktion wurden jeweils 10 µL der angesetzten Lösungen in zwei untereinander liegende Wells einer weißen 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben. In den unteren Reihen der 96-Well-Platte konnte der Versuch mit verschiedenen Zellzahlen, Testverbindungen oder Testkonzentrationen zeitgleich durchgeführt werden. Als Agonisten für diese Versuche dienten CGS21680, Forskolin, NKH 477, NECA sowie CPA.

Anschließend wurden der zuvor aufgetaute Kinase-Glo™ Puffer und das Kinase-Glo® Substrat zusammengegeben und durch Invertieren gemischt, um das später zu verwendende Kinase-Glo® Reagent herzustellen. Dieses wurde in Aliquots für jeweils eine Reihe der 96-Well-Platte abgefüllt und bei -20 °C alle für den aktuellen Versuch nicht nötigen Portionen aufbewahrt.

Die in einer 9 mL fassenden Petrischale befindlichen Zellen wurden mit 500 µL Trypsin abgelöst, das Ablösen mit 8,5 mL Medium gestoppt und 500 µL der Zelllösung zum Weiterführen der Zelllinie in eine neue, bereits mit 8,5 mL Medium befüllte Petrischale gegeben. Die restliche Zelllösung wurde in ein 50 mL Falcon überführt und für 10 Minuten bei 1500 x g zentrifugiert. Das Medium wurde entfernt und das Zellpellet in 3 mL PBS resuspendiert. Ein Teil der Zelllösung wurde in einem 2 mL fassendem Eppendorfgefäß mit PBS verdünnt, anschließend wurde die Anzahl der in 10 µL der Lösung befindlichen Zellen über ein Hemacytometer bestimmt.

Je nach gewünschter Zellzahl wurden zwischen 10 und 30 µL der Zelllösung zusammen mit etwas PBS in die vorher mit der Testsubstanz befüllten Wells gegeben. Hierbei betrug das Gesamtvolumen des PBS und der Zelllösung jeweils 30 µL. Zur Inkubation wurden die Zellen je nach Versuch für 60 – 100 Minuten stehen gelassen.

Bei der Untersuchung eines Antagonisten wurde zunächst ein Agonist mit den Zellen inkubiert, anschließend wurde die Testsubstanz in den zuvor hergestellten verschiedenen Konzentrationen in die Wells gegeben, gefolgt von einer weiteren Inkubation. Die Dauer der beiden Inkubationsschritte variierte zur Validierung des Assays für Antagonisten zwischen 15 und 60 Minuten, ebenso wurde die Reihenfolge der Zugabe von Agonist und dem zu untersuchenden Antagonisten gewechselt.

Nach erfolgter Inkubation wurden in jedes Well 20 μL des zuvor aufgetauten cAMP-Glo™ Lysepuffers zugegeben. Der Lysepuffer wurde direkt wieder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und die Platte bei Raumtemperatur für 15 Minuten geschüttelt. Anschließend wurden 40 μL cAMP-Glo Detektionslösung, hergestellt aus 2,5 μL des in dem Kit befindlichen Protein-Kinase A und 1 mL des aufgetauten cAMP-Glo™ Reaktionspuffers pro Plattenreihe, zugefügt, die Platte bei Raumtemperatur für 45 Sekunden geschüttelt und anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur zur Inkubation stehen gelassen. Daraufhin wurden 80 μL des zu Beginn hergestellten Kinase-Glo® Reagents zugegeben, erneut für 45 Sekunden bei Raumtemperatur geschüttelt und die Platte für weitere 10 Minuten stehen gelassen.

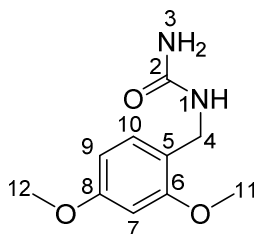
Im Anschluss wurde die Lumineszenz in jedem Well bestimmt. Die EC_{50} -Werte der Testsubstanzen konnten anschließend mit Hilfe des Programms GraphPad Prism, Version 4.00 für Windows der Firma GraphPad Software (La Jolla, USA) berechnet werden.

4.4 Synthesen zur Darstellung der Xanthinderivate

Die Synthesen der Xanthinderivate erfolgten nach oder in Anlehnung an bereits bekannte Literatur. Der Vollständigkeit halber werden hier alle durchgeführten Synthesen aufgeführt und entsprechend mit „aus“ oder „nach“ gekennzeichnet.

N-(2,4-Dimethoxybenzyl)harnstoff (**12**) (aus [88])

Zu einer Lösung aus 50 mL (55,65 g; 328,8 mmol) 2,4-Dimethoxybenzylamin (**11**) in 50 mL Wasser wurden 27,7 mL (332,8 mmol) 12 N Salzsäure gegeben. Anschließend wurden 27,0 g (332,8 mmol) Kaliumcyanat portionsweise zugefügt und das Reaktionsgemisch auf $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt. Nach 90 Minuten wurde die Mischung abgekühlt, der entstandene farblose Niederschlag abfiltriert und mit 150 mL Wasser sowie 20 mL Diethylether gewaschen. Das Produkt wurde bei $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet und durch Umkristallisation aus Ethanol/Wasser (50:50) aufgereinigt.

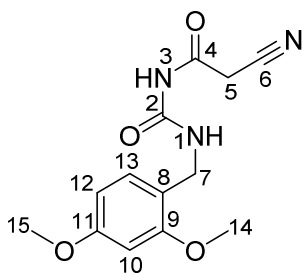


12

Ausbeute:	52,0 g (247,4 mmol; 74 %); farbloser Feststoff.
Schmelzpunkt:	161 °C (Lit.: 162 °C [88])
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6):	δ = 3,76 (s, 3H, 12-H); 3,80 (s, 3H, 11-H); 4,07 (d, J = 5,9 Hz, 2H, 4-H); 5,50 (s, 2H, -NH ₂); 6,13 (t, J = 5,9 Hz, 1H, -NH-); 6,49 (dd, J = 8,2, 2,4 Hz, 1H, 9-H); 6,55 (d, J = 2,3 Hz, 1H, 7-H); 7,09 (d, J = 8,2 Hz, 1H, 10-H).
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6):	δ = 38,20; 55,65; 55,80; 98,62; 104,61; 120,89; 129,18; 158,13; 159,08; 160,01.
MS (ESI):	Exakte Masse: 210,10 g/mol; m/e 211,19 [M+H] ⁺ (100 %).

N-(2,4-Dimethoxybenzyl)-*N'*-cyanomethylharnstoff (**13**) (aus [88])

Zu einer Suspension aus 47,0 g (223,6 mmol) **12** in 350 mL Essigsäureanhydrid wurden 21,165 g (150 mmol) Cyanessigsäure gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 90 Minuten auf 70 °C erwärmt, anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 150 mL Diethylether verdünnt. Der entstandene farblose Niederschlag wurde abfiltriert und zweimal mit je 50 mL Diethylether gewaschen.



13

Ausbeute:	52,4 g (189,1 mmol; 85 %); farbloser Feststoff.
Schmelzpunkt:	200 °C (Lit.: 223 - 224 °C [88])
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6):	δ = 3,77 (s, 3H, 15-H); 3,83 (s, 3H, 14-H); 3,93 (s, 2H, 5-H); 4,26 (d, J = 5,8 Hz, 2H, 7-H); 6,50 (dd, J = 2,4, 8,3 Hz, 1H, 12-H); 6,59 (d, J

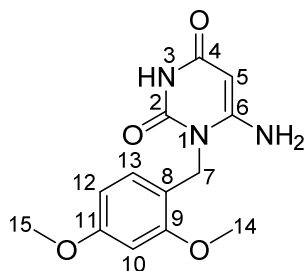
= 2,3 Hz, 1H, 10-H); 7,11 (d, J = 8,3 Hz, 1H, 13-H); 8,30 (s_{br}, 1H, CH₂-NH-); 10,61 (s_{br}, 1H, -NH-).

¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ = 27,21; 38,72; 55,70; 55,96; 98,87; 104,84; 115,56; 118,85; 129,71; 152,65; 158,45; 160,54; 165,57.

MS (ESI): Exakte Masse: 277,11 g/mol; m/e 278,14 [M+H]⁺ (100 %).

6-Amino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)uracil (**14**) (aus [88])

Unter Argon wurden 9,844 g (428 mmol) Natrium in 300 mL trockenes Ethanol gegeben. Daraufhin wurden 45,0 g (214 mmol) **13** zugegeben und zehn Stunden am Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlung und Filtration wurde der Mutterkuchen mit 50 mL Methanol und 20 mL Diethylether gewaschen. Das Produkt wurde in 100 mL Wasser aufgelöst, die Lösung mit konzentrierter Salzsäure neutralisiert und die entstandene Suspension für zwölf Stunden im Kühlschrank stehen gelassen. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit 20 mL Methanol gewaschen und im Exsikkator getrocknet.



14

Ausbeute: 32,88 g (116,1 mmol; 54 %); farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 238 °C (Lit.: 240 - 242 °C [88])

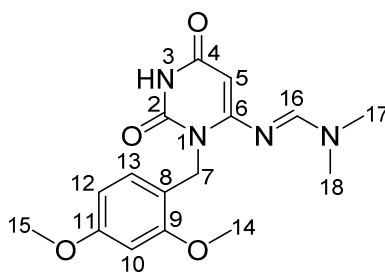
¹H-NMR (DMSO-d₆): δ = 3,76 (s, 3H, 15-H); 3,85 (s, 3H, 14-H); 4,63 (s, 1H, 5-H); 4,88 (s, 2H, 7-H); 6,64 (m, 5H, 10-H, 12-H, 13-H, -NH₂); 10,44 (s_{br}, 1H, -NH).

¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ = 38,76; 55,74; 55,96; 75,88; 98,89; 105,20; 116,78; 126,60; 151,79; 156,49; 157,65; 160,29; 162,83.

MS (ESI): Exakte Masse: 277,11 g/mol; m/e 278,27 [M+H]⁺ (100 %).

1-(2,4-Dimethoxybenzyl)-6-(*N,N*-dimethylaminomethylen)uracil (**15**) (aus [88])

In einem 1 L Becherglas wurden unter Rühren 32,0 g (115,4 mmol) **14** zu 640 mL Dimethylformamid gegeben. Nach Erwärmung auf 40 °C wurden 30,4 mL (27,52 g; 236,8 mmol) *N,N*-Dimethylformamiddimethylacetal zugefügt und die Reaktionsmischung vier Stunden gerührt. Die Lösung wurde unter Rühren in 1300 mL Eiswasser gegeben. Nach einer Stunde wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert und dreimal mit je 100 mL siedendem Methanol extrahiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt aus Dimethylformamid/Wasser (50:50) umkristallisiert.

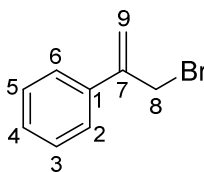


15

- Ausbeute: 26,29 g (79,13 mmol; 69 %); farbloser Feststoff.
- Schmelzpunkt: > 300 °C (Lit.: > 300 °C [88])
- ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 2,85 (s, 3H, 17-H); 3,06 (s, 3H, 18-H); 3,74 (s, 3H, 15-H); 3,81 (s, 3H, 14-H); 5,01 (s, 2H, 7-H); 5,06 (s, 1H, 5-H); 6,44 (dd, *J* = 2,4, 8,4 Hz, 1H, 12-H); 6,55 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H, 10-H); 6,69 (d, *J* = 8,4 Hz, 13-H); 8,04 (s, 1H, 16-H); 10,72 (s, 1H, -NH-).
- ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ = 34,60; 38,76; 40,63; 55,60; 55,83; 82,73; 98,60; 104,88; 118,79; 126,70; 152,29; 156,22; 157,49; 159,67; 161,03; 163,70.
- MS (ESI): Exakte Masse: 332,15 g/mol; *m/e* 333,13 [M+H]⁺ (100 %).

Allylphenylbromid (**25**) (aus [103])

Unter Rühren wurde eine Lösung aus 4,01 g (11,25 mmol) *N*-Bromsuccinimid in 80 mL Dichlormethan und 15 mL Tetrahydrofuran hergestellt. Anschließend wurden 620 mg (1 mmol) Ytterbium(III)-trifluormethansulfonat, 126 µL (109 mg; 1 mmol) Trimethylchlorsilan sowie 2,6 mL (2,36 g; 20 mmol) α-Methylstyrol (**24**) zugegeben und die Mischung eine halbe Stunde gerührt. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit 100 mL Hexan versetzt. Nach Filtration von ausgefallenem Feststoff wurde das Filtrat eingeeengt und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

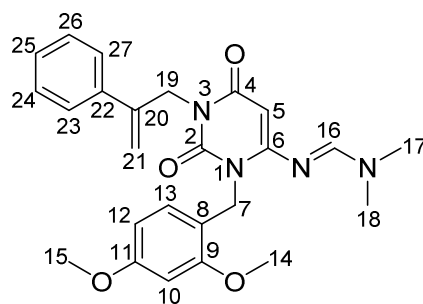
**25**

Ausbeute: 1,92 g (9,6 mmol; 48 %); farbloses Öl.

MS (ESI): Exakte Masse: 197,97 g/mol; m/e 198,95 [M+H]⁺ (100 %).

3-Allylphenyl-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-6-(N,N-dimethylaminomethylen)uracil (16) (nach [88])

Bei Raumtemperatur wurden 1,163 g (3,5 mmol) **15** zusammen mit 1,213 g (3,73 mmol) trockenem Cäsiumcarbonat zu einer Mischung aus 1,6 mL trockenem Acetonitril und 7 mL trockenem Dimethylformamid gegeben. Nach zehn Minuten wurden portionsweise 0,759 g (3,85 mmol) **7** zugefügt und die Suspension über Nacht gerührt. Die Lösungsmittel wurden unter verminderten Druck entfernt, der Rückstand mit 10 mL Wasser aufgenommen und dreimal mit je 10 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 15 mL 0,5 N Natriumhydroxid-Lösung und anschließend zweimal mit je 10 mL Wasser gewaschen. Daraufhin wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde mit 20 mL siedendem Methanol ausgewaschen, anschließend wurde das gereinigte Produkt abfiltriert und im Exsikkator getrocknet.

**16**

Ausbeute: 1,324 g (2,95 mmol; 84 %); farbloser Feststoff.

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 2,95 (s, 3H, 17-H); 3,06 (s, 3H, 18-H); 3,80 (s, 3H, 15-H); 3,82 (s, 3H, 14-H); 5,01 (s, 3H, 7-H, 5-H); 5,24 (s, 2H, H-19); 5,25 (d, J = 31,3 Hz, 2H, 21-H); 6,39 (dd, J = 2,4, 8,3 Hz, 1H, 12-H); 6,45 (d, J = 2,3 Hz, 1H, 10-H); 6,75 (d, J = 8,3 Hz, 1H, 13-H); 7,34 (m, 3H, 24-H,

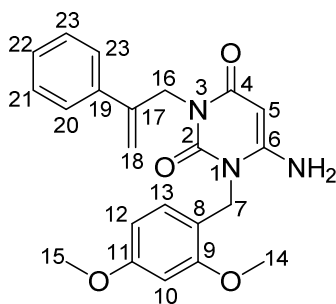
25-H, 26-H); 7,54 (dd, $J = 2,4, 9,6$ Hz, 2H, 23-H, 27-H); 7,67 (s, 1H, 16-H).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 34,80; 40,79; 41,08; 44,10; 55,34; 55,36; 83,41; 98,32; 104,00; 111,13; 118,62; 126,64; 126,97; 127,62; 128,20; 139,73; 143,57; 152,24; 154,07; 157,52; 159,65; 159,74; 163,40$.

MS (ESI): Exakte Masse: 448,21 g/mol; m/e 449,16 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %).

3-Allylphenyl-6-amino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)uracil (**17**) (nach [88])

Zu einer Lösung bestehend aus 1,39 mL wässrigem 2 N Kaliumhydroxid (2,78 mmol) in 2,25 mL Methanol wurden 0,2 g (0,45 mmol) **16** gegeben und die Reaktionsmischung für 1,5 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Es wurde mit konzentrierter Salzsäure neutralisiert und das Methanol unter verminderten Druck entfernt. Der wässrige Rückstand wurde mit 5 mL Wasser verdünnt und dreimal mit je 5 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit jeweils 10 mL Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter verminderten Druck und anschließend im Hochvakuum entfernt, das Rohprodukt aus Methanol umkristallisiert.



17

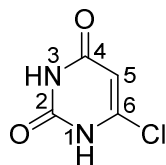
Ausbeute: 24 mg (0,06 mmol; 13 %); farbloser Feststoff.

MS (ESI): Exakte Masse: 393,17 g/mol; m/e 394,17 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %).

6-Chloruracil (**27**) (aus [110])

Zu einer Lösung aus 22,88 g (518 mmol) Natriumhydroxid in 235 mL Wasser wurden unter Rühren 26,0 g (142 mmol) 2,4,6-Trichlorpyrimidin (**26**) gegeben. Es wurde 3,5 Stunden bei 125 °C zum Rückfluss erhitzt, anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit konzentrierter Salzsäure auf pH = 2-3 angesäuert und über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Der entstan-

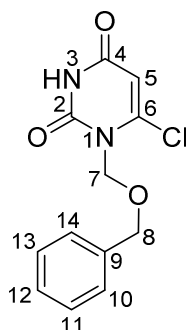
dene farblose Niederschlag wurde abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und bei 80 °C getrocknet.

**27**

Ausbeute: 16,35 g (111,6 mmol; 79 %); farbloser Feststoff.
 Schmelzpunkt: Zersetzung bei 274 °C (Lit.: 252 - 253 °C [110])
¹H-NMR (DMSO-d₆): δ = 5,76 (d, J = 1,8 Hz, 1H, 5-H); 11,32 (s, 1H, -NH); 12,08 (s, 1H, -NH).
¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ = 100,34; 145,18; 150,80; 163,14.
 MS (ESI): Exakte Masse: 145,99 g/mol; m/e 314,9 [2M+Na]⁺ (73 %), 460,9 [3M+Na]⁺ (67 %).

1-Benzylloxymethyl-6-chlorouracil (**28**) (aus [112])

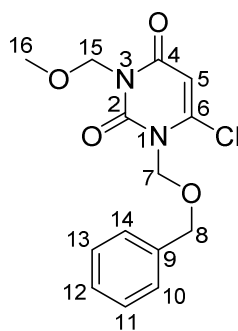
Unter Argon wurden 16,35 g (111,6 mmol) **27** in 200 mL trockenem Dimethylformamid gelöst. Es wurde auf 0 °C gekühlt, 1,40 g (173,1 mmol) Lithiumhydrid zugegeben und fünf Minuten rühren gelassen. Anschließend wurden 20,84 g (18,4 mL; 132,7 mmol) Benzylloxymethylchlorid zugegeben und weitere 30 Minuten gerührt. Nach Zugabe von 500 mL 2 %-iger Natriumhydroxid-Lösung wurde mit 400 mL Toluol extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit konzentrierter Salzsäure auf pH = 3 angesäuert, der entstandene farblose Niederschlag wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte durch Umkristallisation aus 95 % Ethanol.

**28**

Ausbeute: 18,59 g (69,7 mmol; 63 %); farbloser Feststoff.
 Schmelzpunkt: 158 °C (Lit.: 154 - 155 °C [112])
¹H-NMR (DMSO-d₆): δ = 4,61 (s, 2H, 8-H); 5,45 (s, 2H, 7-H); 5,77 (d, J = 2,0 Hz, 1H, 5-H); 7,27 (m, 5H, 10-H - 14-H); 11,60 (s, 1H, -NH).
¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ = 71,55; 74,15; 103,61; 127,72; 127,94; 128,45; 137,38; 146,44; 150,84; 161,30.
 MS (ESI): Exakte Masse: 266,05 g/mol; m/e 266,71 [M+H]⁺ (100 %).

1-Benzylloxymethyl-6-chlor-3-methoxymethyluracil (**29**) (aus [112])

Unter Argon wurden 6,6 g (24,7 mmol) **28** in 130 mL trockenem Dimethylformamid gelöst. Es wurde auf 0 °C gekühlt, 297 mg (36,7 mmol) Lithiumhydrid zugegeben und zehn Minuten rühren gelassen. Anschließend wurden 3,03 g (4 mL; 37,3 mmol) Methoxymethylchlorid zugegeben und weitere 30 Minuten gerührt. Nach Zugabe von 100 mL Wasser wurde mit 70 mL Dichlormethan extrahiert. Es wurde zwei Mal mit je 50 mL Wasser und anschließend mit 50 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck und im Anschluss im Hochvakuum entfernt. Es folgte eine säulenchromatographische Aufarbeitung mit Hexan/Ethylacetat (50:50) als Eluens.

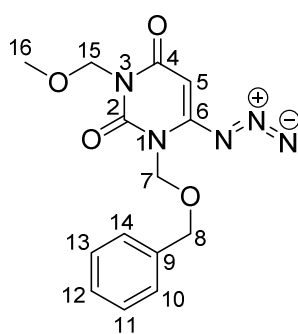


29

Ausbeute: 5,88 g (18,9 mmol; 77 %); farbloses Öl.
¹H-NMR (CDCl₃): δ = 3,41(d, J = 1,9 Hz, 3H, 16-H); 4,69 (s, 2H, 8-H); 5,28 (d, J = 1,6 Hz, 2H, 15-H); 5,55 (s, 2H, 7H); 5,90 (s, 1H, 5-H); 7,31 (m, 5H, 10-H - 14-H).
¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 57,96; 72,17; 72,52; 75,29; 103,12; 127,57; 128,01; 128,44; 137,10; 146,09; 151,33; 160,32.
 MS (ESI): Exakte Masse: 310,07 g/mol; m/e 311,05 [M+H]⁺ (100 %).

6-Azido-1-benzyloxymethyl-3-methoxymethyluracil (30) (nach [113])

Unter Argon wurden 10,34 g (33,28 mmol) **29** in 50 mL trockenem Dimethylformamid gelöst. Es wurden 2,37 g (36,8 mmol) Natriumazid zugegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung in 100 mL Wasser gegeben und drei Mal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit 100 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch mit Hexan/Ethylacetat (40:60) als Eluens aufgereinigt, wodurch ein farbloses Öl erhalten wurde.

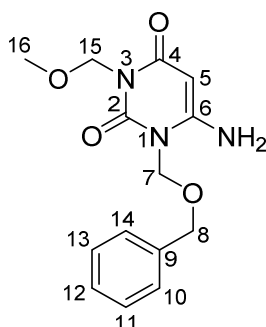
**30**

Ausbeute:	9,467 g (29,767 mmol; 90 %); farbloses Öl.
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3):	δ = 3,41(s, 3H, 16-H); 4,68 (s, 2H, 8-H); 5,31 (s, 2H, 15-H); 5,38 (s, 2H, 7H); 5,52 (s, 1H, 5-H); 7,32 (m, 5H, 10-H - 14-H).
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3):	δ = 57,86; 72,22; 72,31; 75,69; 88,35; 127,66; 128,04; 128,47; 137,18; 151,29; 151,43; 161,10.
MS (ESI):	Exakte Masse: 317,11 g/mol; m/e 318,09 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (59 %).

6-Amino-1-benzyloxymethyl-3-methoxymethyluracil (31) (nach [113])

Unter Rühren wurden 8,47 g (26,5 mmol) **30** in 65 mL Isopropylalkohol gelöst. Nach portionsweiser Zugabe von 259 mg (39,4 mmol) Natriumborhydrid wurde eine Stunde bei 110 °C unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurden langsam 20 mL Wasser zugefügt, dreimal mit jeweils 20 mL Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit 30 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung sowie zweimal mit jeweils 20 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter verminderten Druck und daraufhin im Hochvakuum entfernt. Die

Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit Ethylacetat/Methanol (95:5) als Eluens.



31

Ausbeute: 6,92 g (23,36 mmol; 88 %); farbloser Feststoff.

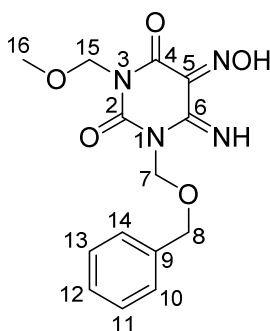
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 3,47(s, 3H, 16-H); 4,70 (s, 2H, 8-H); 5,05 (s, 1H, 5-H); 5,23 (s_{br}, 2H, -NH₂); 5,38 (s, 2H, 15-H); 5,58 (s, 2H, 7H); 7,33 (m, 5H, 10-H - 14-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 57,66; 71,69; 72,06; 73,62; 87,24; 127,99; 128,66; 136,43; 151,54; 154,36; 162,87, 164,53.

MS (ESI): Exakte Masse: 291,12 g/mol; m/e 291,98 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %).

6-Amino-1-benzyloxymethyl-3-methoxymethyl-5-nitrosouracil (bzw. *tautomeres Oxim*) (**32**) (nach [115])

Unter Rühren wurden 3,74 g (12,8 mmol) **31** in einer Mischung aus 5 mL Ethanol und 45 mL Wasser bei Raumtemperatur gelöst. Es wurden 0,88 g (12,8 mmol) Natriumnitrit und anschließend zwei Tropfen konzentrierte Salzsäure hinzugefügt. Nach zwei Stunden wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert und mit Ethanol gewaschen.

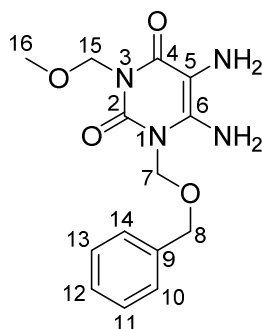


32

Ausbeute:	2,80 g (8,74 mmol; 68 %); violetter Feststoff.
Schmelzpunkt:	146 °C
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6):	δ = 3,41 (s, 3H, 16-H); 4,63 (s, 2H, 8-H); 4,67 (2, 1H, -NH); 5,36 (s, 2H, 7-H); 5,60 (s, 2H, 15H); 7,25 (m, 5H, 10-H - 14-H); 13,09 (s _{br} , 1H, -OH).
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6):	δ = 57,73; 71,89; 72,03; 72,36; 128,00; 128,17; 128,44; 137,02; 138,64; 145,53; 149,84; 160,47.
MS (ESI):	Exakte Masse: 320,30 g/mol; m/e 321,12 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %).

1-Benzylloxymethyl-5,6-diamino-3-methoxymethyluracil (33) (nach [88])

Zu einer Lösung aus 2,114 g (6,6 mmol) **32** in 20 mL Methanol wurden 0,8 g Zink-Pulver sowie 5,1 mL Ameisensäure gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde eine Stunde rühren gelassen, daraufhin wurde das überschüssige Zink abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Die methanolische Lösung wurden unter vermindertem Druck eingeeengt, der Rückstand in 30 mL Dichlormethan aufgenommen und dieses mit 20 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung und anschließend zweimal mit jeweils 20 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Dichlormethan unter vermindertem Druck sowie im Hochvakuum entfernt.

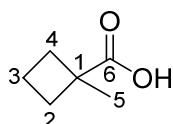


33

Ausbeute:	0,913 g (3,0 mmol; 45 %); farbloser Feststoff.
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3):	δ = 2,98 (s _{br} , 2H, -NH ₂); 3,46 (s, 3H, 16-H); 4,68 (s, 2H, 8-H); 5,40 (s, 2H, 7-H); 5,52 (s _{br} , -NH ₂); 5,56 (s, 2H, 15H); 7,37 (m, 5H, 10-H - 14-H).
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3):	δ = 57,65; 71,56; 72,40; 73,78; 128,10; 128,35; 128,60; 136,44; 150,95; 161,45.
MS (ESI):	Exakte Masse: 306,13 g/mol; m/e 307,19 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %).

1-Methylcyclobutan-1-carbonsäure (**39**) (aus [117])

Bei -50 °C wurden 6,9 mL (5,00 g; 50 mmol) Diisopropylamin und anschließend 67 mL Tetrahydrofuran zu 31,25 mL (50 mmol) *n*-Buthyllithium (1,6 M in Hexan) gegeben. Nach zehn Minuten wurde auf 0 °C aufgewärmt und 30 Minuten gerührt. Nach erneuter Kühlung auf -50 °C wurden 2,2 mL (2,3 g; 23,3 mmol) Cyclobutancarbonsäure (**38**) zugegeben und die Reaktionsmischung für 30 Minuten auf 50 °C erhitzt. Anschließend wurden bei 0 °C 2,1 mL (4,7 g; 33,3 mmol) Methyljodid in 3 mL Tetrahydrofuran über einen Zeitraum von zehn Minuten tropfenweise zugefügt. Nachdem zehn Minuten bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde die Mischung erneut für zwei Stunden auf 50 °C erhitzt. Es wurde abkühlen gelassen, mit konzentrierter Salzsäure angesäuert und dreimal mit je 20 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit jeweils 30 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung, 10 %-iger Natriumthiosulfat-Lösung und erneut mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und der Diethylether unter vermindertem Druck entfernt.



39

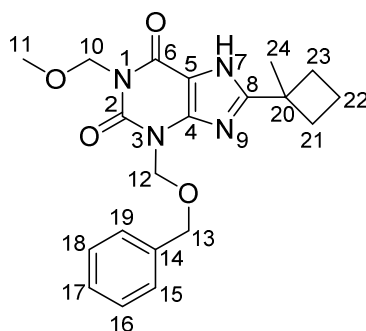
Ausbeute:	2,32 g (20,3 mmol; 87 %); farbloses Öl.
¹ H-NMR (CDCl ₃):	δ = 1,43 (s, 3H, 5-H); 1,96 (m, 4H, 2-H, 4-H); 2,54 (m, 2H, 3-H); 10,83 (s _{br} , 1H, -OH).
¹³ C-NMR (CDCl ₃):	δ = 15,17; 23,64; 31,41; 43,21; 184,63.
MS (ESI):	Exakte Masse: 114,07 g/mol; m/e 115,02 [M+H] ⁺ (100 %).

3-Benzoyloxymethyl-1-methoxymethyl-8-(1-methylcyclobutyl)xanthin (**35**) (nach [119] bzw. [120] sowie [88])

a) Unter Argon wurden 370 mg (3,26 mmol) **39** in 4 mL trockenem Dimethylformamid gelöst. Nach Kühlung auf 0 °C wurden 260 µL (330 mg; 3,30 mmol) *N*-Methylmorpholin sowie tropfenweise 420 µL (450 mg; 3,30 mmol) Isobutyrochlorformiat zugefügt und fünf Minuten gerührt. Nach portionsweiser Zugabe von 600 mg (1,95 mmol) **33** wurde zwölf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in 10 mL Eiswasser gegeben und zweimal mit jeweils 10 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen

wurden zweimal mit je 10 mL Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in einer Mischung aus 15,8 mL 2 N wässriger Natriumhydroxid-Lösung sowie 9,4 mL 1,4-Dioxan aufgenommen und das Reaktionsgemisch für acht Stunden auf 85 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit 20 mL Wasser verdünnt und mit konzentrierter Salzsäure auf pH = 3-4 angesäuert. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und bei 85 °C getrocknet.

b) In einem alternativen zweiten Ansatz wurden 708 mg (2,30 mmol) **33** in 50 mL Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von 418 µL (3,99 mmol) Triethylamin wurde auf -10 °C gekühlt und 340 mg (3,00 mmol) **39** hinzugegeben. Anschließend wurden 1,90 mL (955 mg; 3,00 mmol) einer 50 %-igen Tripropylphosphonsäureanhydrid-Lösung in Ethylacetat zugefügt und zwei Stunden bei -10 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 50 mL Dichlormethan verdünnt, die organische Phase zweimal mit jeweils 40 mL Wasser gewaschen, anschließend wurden die wässrigen Phasen vereinigt und zweimal mit je 20 mL Dichlormethan gewaschen. Alle organischen Phasen wurden vereint, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt, der Rückstand auch hier in einer Mischung aus 2,2 mL 2 N wässriger Natriumhydroxid-Lösung sowie 1,3 mL 1,4-Dioxan aufgenommen und das Reaktionsgemisch für acht Stunden auf 85 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit 10 mL Wasser verdünnt und mit konzentrierter Salzsäure auf pH = 3-4 angesäuert. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und bei 85 °C getrocknet.

**35**

Ausbeute: a) 150 mg (0,39 mmol; 21 %); b) 90 mg (0,23 mmol; 10 %); farbloser Feststoff

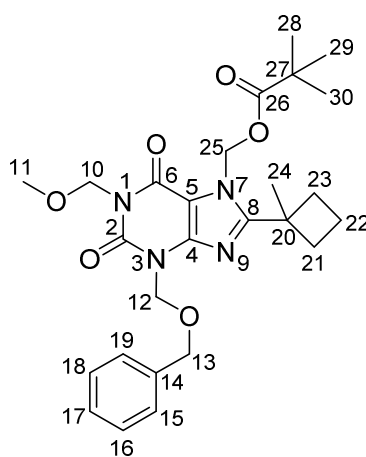
¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1,18 (d, J = 4,4 Hz, 3H, 24-H); 1,62 (s, 3H, 11-H); 2,12 (m, 4H, 21-H, 23-H); 2,74 (m, 2H, 22-H); 4,84 (s, 2H, 12-H); 5,51 (s, 2H, 13-

H); 5,76 (s, 2H, 10-H); 7,36 (m, 6H, 15-H - 19-H, -NH).

MS (ESI): Exakte Masse: 384,18 g/mol; m/e 385,02 [M+H]⁺ (100 %).

3-Benzoyloxymethyl-1-methoxymethyl-8-(1-methylcyclobutyl)-7-pivaloyloxymethylxanthin (37)
(nach [88])

Unter Argon wurden 260 mg (0,68 mmol) **35** in 13 mL trockenem Dimethylformamid gelöst. Nach Zugabe von 150 mg (1,09 mmol) trockenem Kaliumcarbonat wurde für eine Stunde auf 80 °C erhitzt. Anschließend wurden 127,4 µL (133,1 mg; 0,9 mmol) Chlormethylpivalat zugegeben und 120 Stunden bei 80 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in 20 mL Wasser gegeben und dreimal mit je 15 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 30 mL 10 %-iger Zitronensäure und anschließend zweimal mit jeweils 30 mL Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck und im Anschluss im Hochvakuum entfernt.



37

Ausbeute: 242 mg (0,49 mmol; 72 %); blass gelbes Öl.

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1,63 (s, 3H, 24-H); 1,17 (s, 9H, 28-H - 30-H); 2,20 (m, 4H, 21-H, 23-H); 2,73 (m, 2H, 22-H); 3,46 (s, 3H, 11-H); 4,81 (s, 2H, 25-H); 5,46 (s, 2H, 12-H); 5,67 (s, 2H, 13-H); 6,05 (s, 2H, 10-H); 7,37 (m, 5H, 15-H - 19-H).

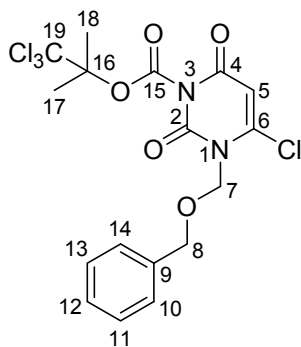
¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 16,21; 26,83; 26,94; 27,04; 33,25; 38,73; 38,79; 57,64; 68,26; 72,04; 72,14; 72,29; 106,60; 127,75; 127,76; 128,28; 128,070; 137,79; 147,97; 151,81; 154,34; 162,32; 177,07.

MS (ESI): Exakte Masse: 498,25 g/mol; m/e 499,05 [M+H]⁺ (100 %).

1-Benzylloxymethyl-6-chlor-3-(1,1-dimethyl-2,2,2-trichlorethyloxycarbonyl)uracil (40)

(nach [107])

Unter Argon wurden 5,76 g (23,0 mmol) **28** in 50 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Bei 0 °C wurden 30 mL trockenes Pyridin sowie anschließend 13,82 g (57,60 mmol) 1,1-Dimethyl-2,2,2-trichlorethylchlorformiat zugegeben und 90 Minuten in der Kälte, anschließend zwölf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde in 100 mL Wasser gegeben und dreimal mit jeweils 75 mL Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und mit 150 ml 10 %-iger Salzsäure sowie mit 150 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Anschließend wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

**40**

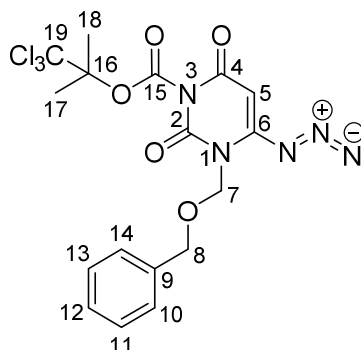
Ausbeute:	9,95 g (20,9 mmol; 91 %); farbloser Feststoff.
Schmelzpunkt:	133 °C
¹ H-NMR (CDCl ₃):	δ = 1,68 (s, 6H, 17-H, 18-H); 5,60 (s, 2H, 8-H); 5,90 (s, 2H, 7-H); 5,92 (s, 1H, 5-H); 7,38 (m, 5H, 10-H - 14-H).
¹³ C-NMR (CDCl ₃):	δ = 20,98; 72,37; 75,06; 81,24; 93,42; 103,23; 127,70; 128,25; 128,67; 136,78; 146,38; 147,10; 148,57; 157,57.
MS (ESI):	Exakte Masse: 467,98 g/mol; m/e 468,92 [M+H] ⁺ (100 %).

6-Azido-1-benzylloxymethyl-3-(1,1-dimethyl-2,2,2-trichlorethyloxycarbonyl)uracil (41)

(nach [113])

In 150 mL trockenem Dimethylformamid wurden 9,5 g (20,2 mmol) **40** gelöst. Anschließend wurden 2,0 g (30,8 mmol) Natriumazid zugegeben und 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in 150 mL Wasser gegeben. Nach dreimaliger Extraktion mit jeweils 100 mL Ethylacetat wurden die organischen Phasen vereinigt, mit

150 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen sowie über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck und anschließend im Hochvakuum entfernt.

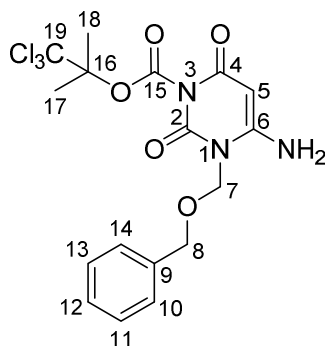


41

Ausbeute:	8,43 g (17,7 mmol; 88 %); farbloser Feststoff.
Schmelzpunkt:	Zersetzung bei 147 °C.
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3):	$\delta = 2,14$ (s, 6H, 17-H, 18-H); 4,72 (s, 2H, 8-H); 5,43 (s, 2H, 7-H); 5,46 (s, 1H, 5-H); 7,38 (m, 5H, 10-H - 14-H).
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3):	$\delta = 20,97$; 72,56; 76,41; 88,30; 93,22; 104,57; 127,73; 128,25; 128,65; 136,93; 146,72; 148,66; 152,21; 158,31.
MS (ESI):	Exakte Masse: 476,69 g/mol; m/e 477,88 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %).

6-Amino-1-benzyl-3-(1,1-dimethyl-2,2,2-trichloroethoxycarbonyl)uracil (42)
(nach [114])

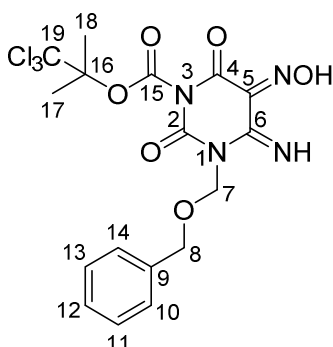
Zu 150 mL Isopropylalkohol wurden 8,0 g (16,8 mmol) **41** gegeben. Es wurde auf 0 °C gekühlt, nach portionsweiser Zugabe von 436 mg (18,0 mmol) Natriumborhydrid wurde eine Stunde bei Raumtemperatur rühren gelassen. Anschließend wurden 100 mL Wasser zugegeben und dreimal mit jeweils 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit Hexan/Ethylacetat (70:30) als Eluens aufgereinigt.

**42**

- Ausbeute: 3,42 g (7,6 mmol; 45,2 %); farbloser Feststoff.
- $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2,10 (d, J = 7,0 Hz, 6H, 17-H, 18-H); 4,69 (s, 2H, 8-H); 4,95 (s, 1H, 5-H); 5,04 (s, 2H, -NH₂); 5,32 (s, 2H, 7-H); 7,38 (m, 5H, 10-H - 14-H).
- $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 20,96; 71,93; 73,30; 81,24; 92,74; 104,75; 128,17; 128,55; 128,73; 136,07; 147,64; 149,08; 155,61; 160,21.
- MS (ESI): Exakte Masse: 449,03 g/mol; m/e 449,98 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %).

6-Amino-1-benzyloxymethyl-5-nitroso-3-(1,1-dimethyl-2,2,2-trichlorethyloxycarbonyl)uracil (bzw. *tautomerer Oxim*) (**43**) (nach [115])

Bei Raumtemperatur wurde eine Suspension aus 500 mg (1,1 mmol) **42** in 1 mL Ethanol und 10 mL Wasser erstellt. Es wurden 76,0 mg (1,1 mmol) Natriumnitrit sowie fünf Tropfen konzentrierte Salzsäure zugefügt. Nach 18 Stunden wurde das Reaktionsgemisch für fünf Stunden auf 45 °C erhitzt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und zweimal mit jeweils 10 mL Wasser gewaschen.

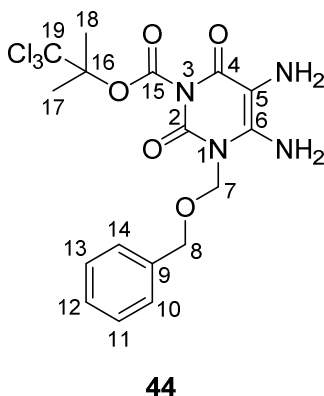
**43**

- Ausbeute: 240 mg (0,5 mmol; 45 %); violetter Feststoff.
- Schmelzpunkt: 138 °C

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ = 2,06 (s, 6H, 17-H, 18-H); 4,65 (s, 2H, 8-H); 5,53 (s, 2H, 7-H); 7,30 (m, 5H, 10-H - 14-H); 9,49 (s_{br} , 1H, -NH); 12,97 (s_{br} , 1H, -OH).
 $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ = 21,14; 71,45; 92,76; 104,74; 128,27; 128,32; 128,71; 137,64; 146,13; 147,22; 147,46.
 MS (ESI): Exakte Masse: 478,02 g/mol; m/e 480,97 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %).

1-Benzylloxymethyl-5,6-diamino-3-(1,1-dimethyl-2,2,2-trichlorethyloxycarbonyl)uracil (44**)**
 (nach [88])

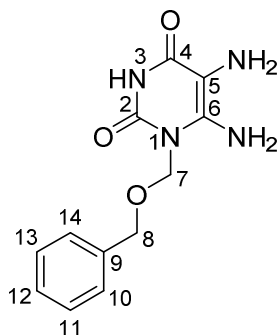
In einer Mischung aus 25 mL 25 %-iger Ammoniak-Lösung und 25 mL Methanol wurden 500 mg (1,0 mmol) **43** gegeben und auf 80 °C erhitzt. Nach Zugabe von 696 mg (4,0 mmol) Natriumdithionit wurde fünf Stunden bei 80 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 8 °C gekühlt, der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit 20 mL Wasser sowie 10 mL Diethylether gewaschen und an der Luft trocknen gelassen. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit Ethylacetat/Methanol/Trifluoressigsäure (85:15:0,5) als Eluens aufgereinigt.



Ausbeute: 86 mg (0,18 mmol; 18 %); weißer Feststoff.
 MS (ESI): Exakte Masse: 464,04 g/mol; m/e 465,01 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %).

1-Benzylloxymethyl-5,6-diaminouracil (45**)** (nach [88])

Diese Verbindung entstand als Nebenprodukt der Synthese des obigen 1-Benzylloxymethyl-5,6-Diamino-3-(2,2,2-trichlor-1,1-dimethylethylcarboxy)uracils **44** und wurde aufgrund der deutlich langsameren Retention ebenfalls durch die säulenchromatische Aufarbeitung mit Ethylacetat/Methanol/Trifluoressigsäure (85:15:0,5) als Eluens erhalten.

**45**

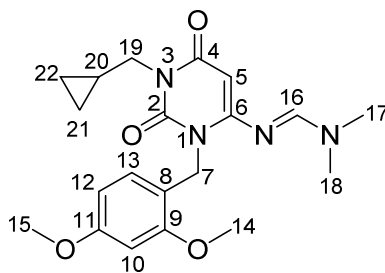
Ausbeute: 133 mg (0,51 mmol; 51 %); weißer Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2,99 (s, 2H, -NH₂); 4,58 (s, 2H, 8-H); 5,39 (s, 2H, 7-H); 6,02 (s, 2H, -NH₂); 7,32 (m, 5H, 10-H - 14-H); 10,73 (s_{br}, 2H, -NH₂).

MS (ESI): Exakte Masse: 262,11 g/mol; m/e 263,09 [M+H]⁺ (73 %).

3-Cyclopropylmethyl-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-6-(N,N-dimethylaminomethylen)uracil (46)
(nach [88])

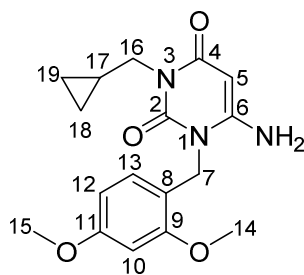
Bei Raumtemperatur wurden 9,37 g (28,2 mmol) **15** sowie 8,28 g (60,0 mmol) trockenes Kaliumcarbonat in 100 mL trockenes Dimethylformamid gegeben und eine Stunde gerührt. Anschließend wurden 3,2 μL (4,45 g; 33 mmol) Brommethylcyclopropan zugefügt und 72 Stunden auf 80 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch in 200 mL Eiswasser gegeben und 30 Minuten gerührt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit jeweils 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung/gesättigter Natriumchlorid-Lösung (150/100 mL) sowie Wasser/gesättigter Natriumchlorid-Lösung (150/100 mL) gewaschen. Es wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte säulenchromatographisch mit Ethylacetat/Methanol (94:6) als Eluens.

**46**

Ausbeute:	6,37 g (16,5 mmol; 58 %); farbloser Feststoff.
Schmelzpunkt:	146 °C
¹ H-NMR (CDCl ₃):	δ = 0,46 (m, 4H, 22-H, 21-H); 1,30 (m, 1H, 20-H); 2,94 (s, 3H, 15-H); 3,05 (s, 3H, 14-H); 3,80 (d, J = 7,0 Hz, 8H, 17-H - 19-H); 5,11 (d, J = 1,6 Hz, 1H, 5-H); 5,22 (s, 2H, 7-H); 6,41 (m, 1H, 10-H, 12-H); 6,85 (d, J = 0,3 Hz, 1H, 13-H); 7,63 (s, 1H, 16-H).
¹³ C-NMR (CDCl ₃):	δ = 3,69; 10,12; 34,77; 40,75; 41,03; 45,29; 55,34; 83,78; 98,32; 103,91; 118,75; 127,10; 152,65; 153,84; 157,53; 159,56; 159,63; 163,89.
MS (ESI):	Exakte Masse: 386,20 g/mol; m/e 387,05 [M+H] ⁺ (100 %).

6-Amino-3-cyclopropylmethyl-1-(2,4-dimethoxybenzyl)uracil (**47**) (nach [88])

Zu 5,8 g (15,0 mmol) **46** in 75 mL Methanol wurden 45 mL 2 N Kaliumhydroxid-Lösung gegeben und vier Stunden auf 60 °C erhitzt. Dann wurde auf Raumtemperatur abkühlen gelassen und mit 2 N Salzsäure neutralisiert. Nach Zugabe von 50 mL Wasser wurde dreimal mit jeweils 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, zweimal mit je 50 mL Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck und im Anschluss im Hochvakuum entfernt.

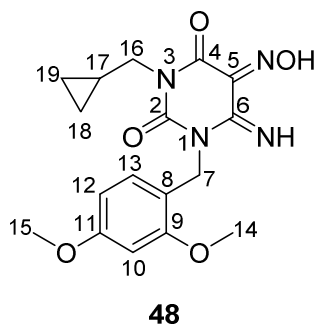


47

Ausbeute:	4,47 g (13,5 mmol; 90 %); farbloses Öl.
¹ H-NMR (CDCl ₃):	δ = 0,43 (m, 4H, 19-H, 18-H); 1,14 (dd, J = 5,9, 1,2 Hz, 2H, 16-H); 1,24 (m, 1H, 17-H); 3,78 (s, 3H, 15-H); 3,87 (s, 3H, 14-H); 4,93 (s, 1H, 5-H); 5,03 (s, 2H, 7-H); 5,79 (s _{br} , 2H, NH ₂); 6,49 (m, 2H, 10-H, 12-H); 7,47 (d, J = 8,4 Hz, 1H, 13-H).
¹³ C-NMR (CDCl ₃):	δ = 3,73; 10,12; 39,42; 45,37; 53,50; 55,44; 55,69; 98,51; 105,77; 116,01; 131,61; 152,71; 154,16; 156,85; 160,98; 163,09.
MS (ESI):	Exakte Masse: 331,37 g/mol; m/e 332,25 [M+H] ⁺ (100 %).

6-Amino-3-cyclopropylmethyl-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-5-nitrosouracil (bzw. *tautomerer Oxim*) (**48**) (nach [88])

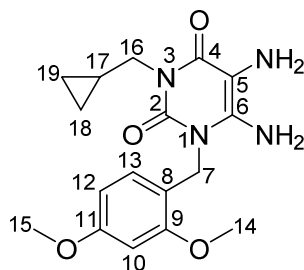
In 92,4 mL 50 %-ige Essigsäure wurde 4,62 g (13,9 mmol) **47** gegeben und auf 70 °C erhitzt. Nach portionsweiser Zugabe von 1,91 g (23 mmol) Natriumnitrit wurde noch 2,5 Stunden bei 70 °C gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mit 30 mL Wasser sowie 5 mL Diethylether gewaschen.



Ausbeute:	2,73 g (7,59 mmol; 55 %); violetter Feststoff.
Schmelzpunkt:	161 °C
¹ H-NMR (CDCl ₃):	δ = 0,52 (m, 4H, 18-H, 19-H); 1,37 (m, 1H, 17-H); 3,84 (s, 3H, 14-H); 3,87 (s, 3H, 15-H); 4,00 (m, 2H, 16-H); 5,10 (s, 2H, 7-H); 6,57 (m, 2H, 10-H, 12-H); 7,55 (d, J = 8,5 Hz, 1H, 13-H). 7,93 (s _{br} , 1H, -NH); 13,59 (s _{br} , 1H, -OH).
¹³ C-NMR (CDCl ₃):	δ = 3,94; 10,01; 38,32; 46,55; 55,58; 55,19; 98,78; 106,84; 113,50; 132,76; 145,60; 150,15; 156,55; 160,26; 161,81.
MS (ESI):	Exakte Masse: 360,14 g/mol; m/e 361,11 [M+H] ⁺ (100 %).

3-Cyclopropylmethyl-5,6-diamino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)uracil (**49**) (nach [88])

Zu 8,25 mL konzentriertem Ammoniak wurden 1,5 g (4,2 mmol) **48** sowie 16,5 mL Wasser gegeben und auf 80 °C erhitzt. Nach Zugabe von 2,15 g (12,4 mmol) Natriumdithionit wurde 18 Stunden bei 80 °C gerührt und über Nacht auf 8 °C gekühlt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit 30 mL Wasser sowie 3 mL Diethylether gewaschen und an der Luft getrocknet.



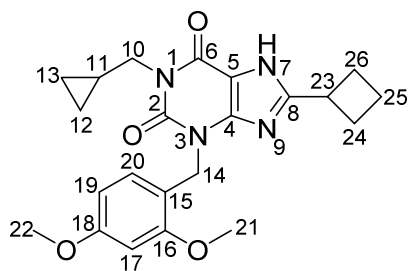
49

Ausbeute:	1,17 g (3,38 mmol; 81 %); farbloser Feststoff.
Schmelzpunkt:	188 °C
¹ H-NMR (CDCl ₃):	δ = 0,37 (m, 4H, 18-H, 19-H); 1,15 (m, 1H, 16-H); 3,34 (s _{br} , -NH ₂); 3,69 (m, 2H, 16-H); 3,76 (s, 3H, 15-H), 3,87 (s, 3H, 14-H); 4,17 (s _{br} , -NH ₂); 5,00 (s, 2H, 7-H); 6,50 (d, J = 10,8 Hz, 1H, 13-H); 6,62 (s, 1H, 10-H); 6,82 (d, J = 8,5 Hz, 1H, 12-H).
¹³ C-NMR (CDCl ₃):	δ = 3,91; 10,54; 55,74; 56,00; 94,04; 98,89; 105,26; 116,85; 127,11; 149,67; 150,35; 157,69; 157,72; 159,39; 160,35.
MS (ESI):	Exakte Masse: 346,16 g/mol; m/e 347,12 [M+H] ⁺ (100 %).

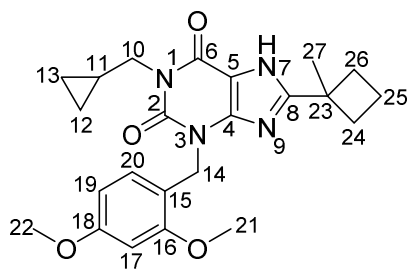
8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(2,4-dimethoxybenzyl)xanthine (50, 51) (nach [119] und [88])

Bei einer Temperatur von 0 °C wurden 2,86 mmol **39** bzw. **40** in 45 mL trockenes Dimethylformamid gegeben. Anschließend wurden jeweils 346 µL (318 mg; 3,15 mmol) *N*-Methylmorpholin sowie 409 µL (429 mg; 3,15 mmol) Isobutylchlorformiat zugefügt. Nach fünf Minuten wurde 1,0 g (2,86 mmol) **49** zugeben und zwölf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in 20 mL Eiswasser gegeben und dreimal mit je 25 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 50 mL Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert, bevor das Lösungsmittel unter vermindertem Druck und anschließend im Hochvakuum entfernt wurde.

Der Rückstand wurde in 8,3 mL 1,4-Dioxan aufgenommen. Nach Zugabe von 13,7 mL 2 N wässriger Natriumhydroxid-Lösung wurde 18 Stunden bei 85 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in 50 mL Wasser gegeben und mit verdünnter Salzsäure auf einen pH-Wert von 3-4 gebracht. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit 15 mL Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Das Rohprodukt wurde aus Methanol/Wasser (80:20) umkristallisiert.

8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-1-(2,4-dimethoxybenzyl)xanthin (50)**50**

- Ausbeute: 810 mg (1,97 mmol; 69 %); farbloser Feststoff.
- Schmelzpunkt: 262 °C
- $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0,51 (m, 4H, 12-H, 13-H); 1,37 (m, 1H, 11-H); 2,11 (m, 2H, 25-H); 2,52 (m, 4H, 24-H, 26-H); 3,88 (m, 7H, 21-H, 22-H, 23-H); 4,14 (d, J = 6,5 Hz, 2H, 10-H); 5,37 (s, 2H, 14-H); 6,46 (m, 2H, 17-H, 19-H); 7,06 (d, J = 8,2 Hz, 1H, 20-H).
- $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 3,80; 10,19; 18,72; 28,27; 34,31; 42,47; 46,04; 55,35; 55,46; 98,53; 104,00; 106,80; 116,98; 128,78; 151,21; 155,89; 158,02; 158,28; 160,28.
- MS (ESI): Exakte Masse: 410,20 g/mol; m/e 411,15 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %).

1-Cyclopropylmethyl-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-8-(1-methylcyclobutyl)xanthin (51)**51**

- Ausbeute: 799 mg (1,89 mmol; 66 %); farbloser Feststoff.
- Schmelzpunkt: 251 °C
- $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0,50 (m, 4H, 12-H, 13-H); 1,38 (m, 1H, 16-H); 1,70 (s, 3H, 27-H); 2,08 (m, 4H, 24-H, 26-H); 2,76 (m, 2H, 25-H); 3,81 (s, 3H, 22-H); 3,86 (s, 3H, 21-H); 4,04 (d, J = 6,3 Hz, 2H, 10-H); 5,38 (s, 2H, 14-H); 6,45 (m, 2H, 17-H, 19-H); 7,13 (d, J = 8,3 Hz, 1H, 20-H).

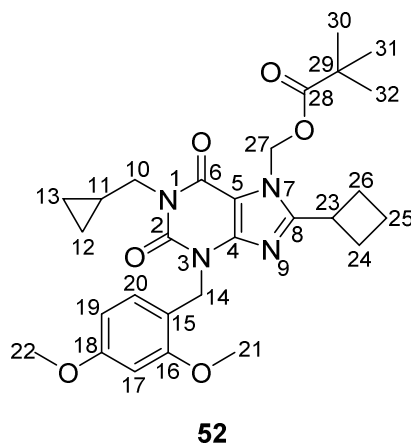
^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 3,76; 10,25; 15,76; 26,10; 33,67; 39,41; 42,15; 45,91; 55,35; 55,48; 98,49; 103,98; 107,04; 117,31; 129,17; 151,36; 155,75; 158,33; 160,24; 162,00$.

MS (ESI): Exakte Masse: 424,21 g/mol; m/e 425,23 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %).

8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(2,4-dimethoxybenzyl)-7-pivaloyloxymethylxanthine (52, 53) (nach [88])

Unter Argon wurden 2,0 mmol **50** bzw. **51** in 20 mL trockenem Dimethylformamid gelöst. Nach Zugabe von 414 mg (3,0 mmol) trockenem Kaliumcarbonat wurde für 30 Minuten auf 60 °C erhitzt. Es wurden 374 μL (392 mg; 2,6 mmol) Chlormethylpivalat in 2 mL trockenem Dimethylformamid zugegeben und 18 Stunden bei 60 °C gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch in 80 mL Eiswasser gegeben und dreimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und mit 60 mL 10 %-iger Zitronensäure gewaschen. Im Anschluss wurde zweimal mit jeweils 50 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Ethylacetat am Rotationsverdampfer entfernt.

8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(2,4-dimethoxybenzyl)-7-pivaloyloxymethylxanthin (52)



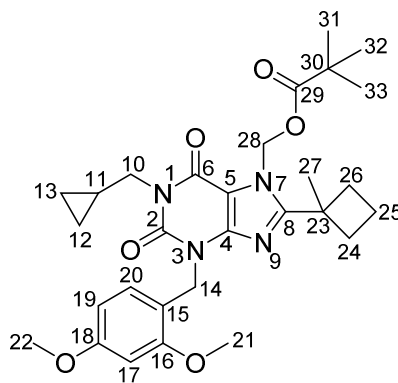
Ausbeute: 930 mg (1,77 mmol; 88 %); blass gelbes Öl.

^1H -NMR (CDCl_3): $\delta = 1,22$ (s, 9H, 30-H - 32-H); 1,30 (m, 4H, 12-H, 13-H); 2,04 (m, 4H, 11-H, 23-H, 25-H); 2,45 (m, 4H, 24-H, 26-H); 3,71 (s, 3H, 22-H); 3,81 (s, 3H, 21-H); 4,13 (m, $J = 7,1$ Hz, 2H, 10-H); 5,32 (s, 2H, 14-H); 6,15 (s, 2H, 27-H); 6,43 (m, 2H, 17-H, 19-H); 7,12 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, 20-H).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 3,71; 10,16; 18,62; 26,91; 27,54; 31,42; 38,79; 41,57; 45,51; 55,31; 55,42; 66,56; 98,44; 103,97; 106,59; 117,31; 129,18; 148,61; 151,44; 154,90; 157,83; 158,28; 160,25; 177,26$.

MS (ESI): Exakte Masse: 524,26 g/mol; m/e 525,27 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %).

1-Cyclopropylmethyl-3-(2,4-dimethoxybenzyl)-8-(1-methylcyclobutyl)-7-pivaloyloxymethyl-xanthin (53)



53

Ausbeute: 775 mg (1,44 mmol; 72 %); farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 142 °C

^1H -NMR (CDCl_3): $\delta = 0,44$ (m, 4H, 12-H, 13-H); 1,23 (s, 9H, 31-H - 33-H); 1,30 (m, 4H, 11-H); 1,60 (s, 3H, 27-H); 2,13 (m, 4H, 24-H, 26-H); 2,69 (m, 2H, 25-H); 3,80 (s, 3H, 22-H); 3,84 (s, 3H, 21-H); 3,92 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H, 10-H); 5,30 (s, 2H, 14-H); 6,08 (s, 2H, 28-H); 6,45 (m, 2H, 17-H, 19-H); 7,16 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, 20-H).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 3,71; 10,18; 16,19; 26,95; 33,24; 38,68; 38,79; 41,58; 45,56; 55,35; 55,45; 68,35; 98,45; 103,95; 106,83; 117,32; 129,36; 148,19; 151,48; 154,77; 158,31; 160,26; 161,41; 177,13$.

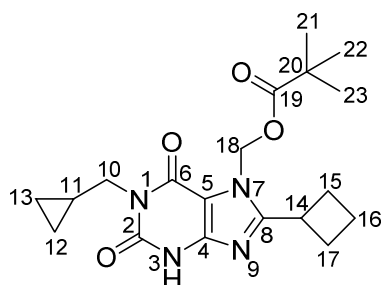
MS (ESI): Exakte Masse: 538,64 g/mol; m/e 539,23 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %).

8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-7-pivaloyloxymethylxanthine (54, 55) (nach [123])

In 4 mL Trifluoressigsäure wurden 1,1 mmol **52** bzw. **53** sowie 439 μL (320 mg; 2,8 mmol) Triethylsilan zugegeben und für 18 Stunden auf 50 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch in 20 mL Eiswasser gegeben und dreimal mit jeweils 15 mL Ethylacetat extrahiert. Es wurde über Celite filtriert und anschließend zweimal

mit jeweils 15 mL Wasser gewaschen. Die Aufreinigung des Produkts erfolgte säulenchromatographisch mit Hexan/Ethylacetat (57:43) als Eluens.

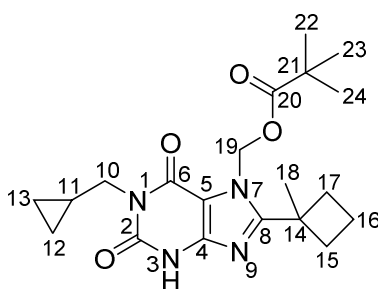
8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-7-pivaloyloxymethylxanthin (**54**)



54

Ausbeute: 190 mg (0,97 mmol; 46 %); farbloser Feststoff.
 Schmelzpunkt: 153 °C
¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0,45 (m, 4H, 12-H, 13-H); 1,29 (s, 9H, 21-H - 23-H); 2,12 (m, 2H, 16-H); 2,51 (m, 4H, 15-H, 17-H); 3,75 (m, 2H, 11-H, 14-H); 3,89 (d, J = 7,1 Hz, 2H, 10-H); 7,30 (s, 2H, 18-H); 11,03 (s_{br}, 1H, N-H).
¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 3,75; 10,14; 18,77; 26,90; 27,76; 31,49; 38,80; 45,05; 66,46; 106,63; 146,91; 151,84; 152,21; 158,36; 177,23.
 MS (ESI): Exakte Masse: 374,20 g/mol; m/e 375,17 [M+H]⁺ (100 %).

1-Cyclopropylmethyl-8-(1-methylcyclobutyl)-7-pivaloyloxymethylxanthin (**55**)



55

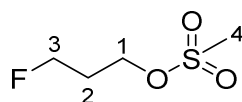
Ausbeute: 325 mg (0,84 mmol; 76 %); farbloser Feststoff.
 Schmelzpunkt: 76 °C
¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0,46 (m J = 9,2 Hz, 4H, 12-H, 13-H); 1,24 (s, 9H, 22-H - 24-H); 1,31 (m, 4H, 11-H); 1,68 (s, 3H, 18-H); 2,23 (m, 4H, 15-H, 17-H); 2,74 (m, 2H, 16-H); 3,91 (d, J = 7,1 Hz, 2H, 10-H); 6,09 (s, 2H, 19-H); 10,76 (1H, -NH).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 3,74; 10,14; 16,43; 26,65; 26,93; 33,20; 38,65; 38,81; 45,01; 68,11; 106,72; 151,54; 155,01; 162,09; 177,03$.

MS (ESI): Exakte Masse: 388,21 g/mol; m/e 389,12 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %).

Methansulfonsäure-3-fluorpropylester (63) (aus [124])

Bei 0 °C wurden 3,35 mL (24,0 mmol) Triethylamin zu einer Lösung aus 1,50 mL (1,56 g; 20 mmol) 3-Fluorpropanol (**6**) in 20 mL Dichlormethan gegeben. Nach langsamen Zutropfen von 1,71 mL (22,0 mmol) Methansulfonylchlorid in 5 mL Dichlormethan wurde zwei Stunden bei 0 °C gerührt. Es wurde mit je 15 mL Wasser, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, filtriert und über Natriumsulfat getrocknet. Das Dichlormethan wurde am Rotationsverdampfer entfernt.



63

Ausbeute: 2,516 g (16,1 mmol; 81 %); farbloses Öl.

^1H -NMR (CDCl_3): $\delta = 2,11$ (m, $J = 0,6, 6,1$ Hz, 2H, 2-H); 3,00 (s, 3H, 4-H); 4,32 (m, $J = 0,9, 6,1$ Hz, 2H, 1-H); 4,55 (m, $J = 0,8, 5,2, 46,9$ Hz, 2H, 3-H).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 30,08$ (d, $J = 20,1$ Hz); 37,05; 65,97 (d, $J = 4,9$ Hz); 81,28.

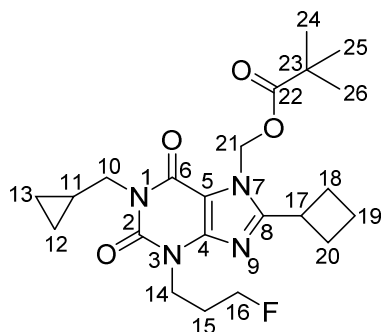
^{19}F -NMR (CDCl_3): $\delta = 223,53$.

MS (ESI): Exakte Masse: 156,03 g/mol; m/e 156,97 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %).

8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(3-fluorpropyl)-7-pivaloyloxymethylxanthine (56, 57)
(nach [88])

Zu einer Lösung aus 0,32 mmol **54** bzw. **55** in 5 mL trockenem Dimethylformamid wurden 67 mg (0,5 mmol) trockenes Kaliumcarbonat gegeben und auf 40 °C erhitzt. Nach 20 Minuten wurden 65 mg (0,4 mmol) **63** zugefügt und 18 Stunden bei 60 °C gerührt. Das unlösliche Material wurde abfiltriert und das Filtrat in 10 mL Eiswasser gegeben. Es wurde dreimal mit jeweils 10 mL Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck und im Anschluss im Hochvakuum entfernt. Die säulenchromatographische Aufarbeitung erfolgte mit Hexan/Ethylacetat (62:38) als Eluens.

8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(3-fluorpropyl)-7-pivaloyloxymethylxanthin (**56**)



56

Ausbeute: 127 mg (0,29 mmol; 92 %); farbloses Öl.

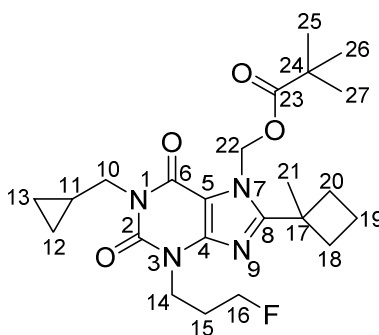
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0,45 (m, 4H, 12-H, 13-H); 1,21 (s, 9H, 24-H - 26-H); 1,28 (m, 3H, 11-H, 15-H); 2,34 (m, 6H, 18-H - 20-H); 3,93 (m, J = 8,6 Hz, 1H, 17-H); 3,93 (d, J = 7,1 Hz, 2H, 10-H); 4,32 (t, J = 7,0 Hz, 2H, 14-H); 4,61 (td, J = 6,0, 47,1 Hz, 2H, 16-H), 7,30 (s, 2H, 21-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 3,76; 10,12; 18,66; 26,92; 27,62; 29,32 (d, J = 20,2 Hz); 31,39; 38,81; 40,10 (d, J = 6,1 Hz); 45,59; 66,52; 81,95 (d, J = 165,4 Hz); 106,65; 148,02; 151,43; 154,72; 158,02; 177,27.

$^{19}\text{F-NMR}$ (CDCl_3): δ = 219,97.

MS (ESI): Exakte Masse: 434,23 g/mol; m/e 435,19 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %).

1-Cyclopropylmethyl-3-(3-fluorpropyl)-8-(1-methylcyclobutyl)-7-pivaloyloxymethylxanthin (**57**)



57

Ausbeute: 90,5 mg (0,20 mmol; 62 %); farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 134 °C

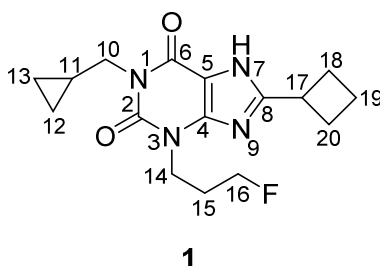
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0,43 (m, 4H, 12-H, 13-H); 1,22 (s, 9H, 25-H - 27-H); 1,59 (s, 3H, 21-H); 2,15 (m, 6H, 18-H - 20-H); 2,28 (m, 1H, 11-H); 2,70 (m, 2H,

	15-H); 3,90 (d, J = 7,1 Hz, 2H, 10-H); 4,29 (t, J = 6,9 Hz, 2H, 14-H); 4,71 (td, J = 6,0, 47,2 Hz, 2H, 16-H), 7,06 (s, 2H, 22-H).
^{13}C -NMR (CDCl_3):	δ = 3,72; 10,11; 16,18; 26,90 (d, J = 1,6 Hz); 27,60; 29,33 (d, J = 20,0 Hz); 33,25; 38,7; 38,77; 40,00 (d, J = 6,2 Hz); 45,48; 68,30; 81,91 (d, J = 165,4 Hz); 106,90; 147,65; 151,48; 154,56; 161,68; 177,07.
^{19}F -NMR (CDCl_3):	δ = 219,93.
MS (ESI):	Exakte Masse: 448,25 g/mol; m/e 449,27 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %).

8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(3-fluorpropyl)xanthine (1, 2) (nach [88])

In 5 mL 7 N methanolischer Ammoniaklösung wurden 0,16 mmol **56** bzw. **57** gegeben und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das unlösliche Material wurde abfiltriert und das Filtrat eingeeengt. Der Rückstand wurde in 3 mL Dichlormethan aufgenommen und mit 2 mL verdünnter Salzsäure gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase dreimal mit je 3 mL Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Dichlormethan wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt aus Acetonitril umkristallisiert.

8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(3-fluorpropyl)xanthin (1)

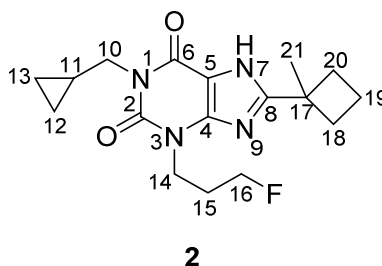


Ausbeute:	57,7 mg (0,14 mmol; 87 %); farbloser Feststoff.
Schmelzpunkt:	206 °C
^1H -NMR (CDCl_3):	δ = 0,47 (m, 4H, 12-H, 13-H); 1,36 (m, 1H, 11-H); 2,31 (m, 8H, 15-H, 18-H - 20-H); 3,76 (m, J = 4,9 Hz, 1H, 17-H); 4,03 (d, m = 7,1 Hz, 2H, 10-H); 4,39 (t, J = 6,9 Hz, 2H, 14-H); 4,65 (td, J = 5,9, 47,0 Hz, 2H, 16-H).
^{13}C -NMR (CDCl_3):	δ = 3,83; 10,15; 18,71; 28,27; 29,00; 29,40; 34,26; 46,12; 77,23; 80,31; 83,59; 106,81; 151,25; 155,72.

^{19}F -NMR (CDCl_3): $\delta = 220,02$.

MS (ESI): Exakte Masse: 320,16 g/mol; m/e 321,08 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %).

1-Cyclopropylmethyl-3-(3-fluorpropyl)-8-(1-methylcyclobutyl)xanthin (2)



Ausbeute: 51,0 mg (0,15 mmol; 93 %); farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 153 °C

^1H -NMR (CDCl_3): $\delta = 0,51$ (m, 4H, 12-H, 13-H); 1,37 (m, 1H, 11-H); 1,71 (s, 3H, 21-H); 2,16 (m, 6H, 18-H - 20-H); 2,74 (m, 2H, 15-H); 4,00 (d, m = 7,1 Hz, 2H, 10-H); 4,38 (t, J = 6,9 Hz, 2H, 14-H); 4,62 (td, J = 6,0, 47,0 Hz, 2H, 16-H).

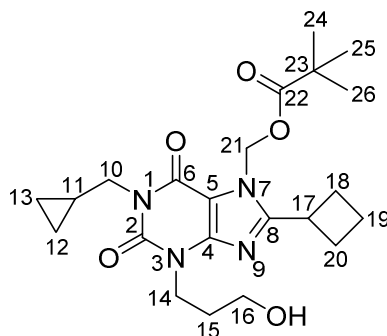
^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 3,79$; 10,19; 15,76; 26,08; 29,05; 29,44; 39,37; 45,99; 81,99 (d, J = 165,3 Hz); 107,04; 148,63; 151,36; 155,58; 162,23.

^{19}F -NMR (CDCl_3): $\delta = 219,87$.

MS (ESI): Exakte Masse: 334,18 g/mol; m/e 335,05 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %).

8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(3-hydroxypropyl)-7-pivaloyloxymethylxanthine (58, 59)
(nach [88])

In 20 mL trockenem Dimethylformamid wurden 0,59 mmol **54** bzw. **55** gelöst. Nach Zugabe von 122 mg (0,9 mmol) trockenem Kaliumcarbonat wurde 30 Minuten auf 40 °C erwärmt. Es wurden 25 μL (40 mg; 10,77 mmol) 1-Brompropanol zugegeben und für acht Stunden auf 40 °C erwärmt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, das Filtrat in 8 mL Eiswasser gegeben und dreimal mit jeweils 5 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

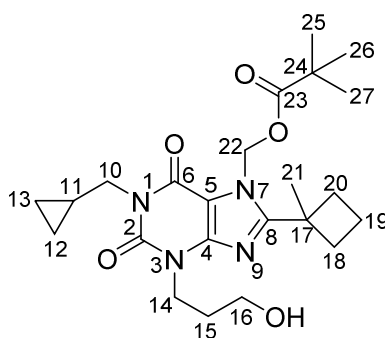
8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(3-hydroxypropyl)-7-pivaloyloxymethylxanthin (58)**58**

Ausbeute: 142,7 mg (0,33 mmol; 56 %); farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0,38 (m, 4H, 12-H, 13-H); 1,14 (s, 10H, 17-H, 24-H - 26-H); 2,02 (m, 4H, 19-H, 15-H); 2,38 (m, 4H, 18-H, 20-H); 3,50 (t, J = 5,5 Hz, 2H, 14-H); 3,71 (m, J = 8,5 Hz, 1H, 11-H); 3,85 (d, J = 7,1 Hz, 2H, 10-H); 4,12 (s_{br}, 1H, -OH); 4,25 (t, J = 5,8 Hz, 2H, 16-H); 6,10 (s, 2H, 21-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 3,71; 10,02; 18,64; 26,84; 27,60; 31,74; 31,30; 38,74; 39,30; 45,63; 57,81; 66,50; 106,35; 148,18; 151,61; 154,50; 157,94; 177,10.

MS (ESI): Exakte Masse: 432,24 g/mol; m/e 433,24 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %).

1-Cyclopropylmethyl-3-(3-hydroxypropyl)-8-(1-methylcyclobutyl)-7-pivaloyloxymethylxanthin (59)**59**

Ausbeute: 185,0 g (0,41 mmol; 69 %); farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0,39 (m, 4H, 12-H, 13-H); 1,16 (s, 9H, 25-H - 27-H); 1,25 (m, 1H, 11-H); 1,56 (s, 3H, 21-H); 1,94 (m, 2H, 19-H); 2,15 (m, 1H, 18-H, 20-H); 2,63 (m, 2H, 15-H); 3,52 (t, J = 5,4 Hz, 2H, 14-H); 3,85 (d, J

= 7,1 Hz, 2H, 10-H); 4,06 (s_{br}, 1H, -OH); 4,24 (t, J = 5,7 Hz, 2H, 16-H), 6,12 (s, 2H, 22-H).

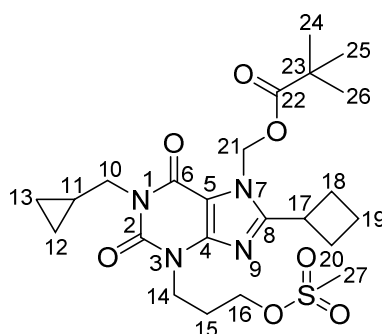
¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 3,70; 10,04; 16,28; 26,80; 26,87; 31,09; 33,06; 38,7; 38,74; 39,58; 45,58; 68,22; 77,78; 106,55; 147,87; 151,69; 154,53; 161,66; 176,92.

MS (ESI): Exakte Masse: 446,25 g/mol; m/e 447,26 [M+H]⁺ (100 %).

8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(3-methylsulfonyloxypropyl)-7-pivaloyloxymethylxanthine
(**60**, **61**) (nach [124])

Bei 0 °C wurden 0,42 mmol **58** bzw. **59** in 3 mL Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von 84,0 µL (0,6 mmol) Triethylamin wurden 39,7 µL (1,2 mmol) Methansulfonylchlorid in 2 mL Dichlormethan so langsam zugetropft, dass die Temperatur nicht über 5 °C stieg. Anschließend wurde zwei Stunden auf 0 °C gekühlt. Die Reaktionsmischung wurde nacheinander mit jeweils 2 mL Wasser, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Dichlormethan unter vermindertem Druck und anschließend im Hochvakuum entfernt.

8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(3-methylsulfonyloxypropyl)-7-pivaloyloxymethylxanthin
(**60**)



60

Ausbeute: 150,0 g (0,29 mmol; 69 %); farbloser Feststoff.

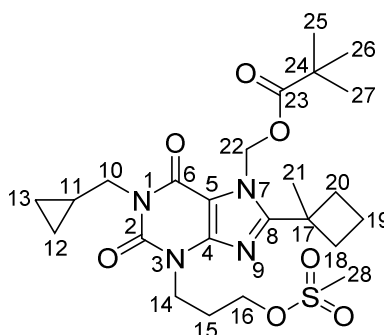
Schmelzpunkt: 109 °C

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0,43 (m, 4H, 12-H, 13-H); 1,12 (s, 9H, 24-H - 26-H); 1,25 (m, 1H, 11-H); 2,36 (m, 8H, 18-H - 20-H, 15-H); 3,03 (s, 3H, 27-H); 3,73 (m, J = 8,6 Hz, 1H, 17-H); 3,89 (d, J = 7,1 Hz, 2H, 10-H); 4,33 (m, 4H, 14-H, 16-H); 6,14 (s, 2H, 21-H).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 3,77; 10,10; 18,63; 26,90; 27,57; 28,06; 31,36; 37,51; 38,79; 39,98; 45,60; 66,53; 67,60; 106,68; 147,82; 151,46; 154,60; 158,08; 177,22$.

MS (ESI): Exakte Masse: 510,21 g/mol; m/e 511,22 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %).

1-Cyclopropylmethyl-8-(1-methylcyclobutyl)-3-(3-methylsulfonyloxypropyl)-7-pivaloyloxymethylxanthin (61)



61

Ausbeute: 129,8 g (0,25 mmol; 59 %), farbloser Feststoff.

Schmelzpunkt: 115 °C

^1H -NMR (CDCl_3): $\delta = 0,40$ (m, 4H, 12-H, 13-H); 1,18 (s, 9H, 25-H - 27-H); 1,26 (m, 1H, 11-H); 1,57 (s, 3H, 21-H); 2,20 (m, 6H, 15-H, 18-H, 20-H); 2,70 (m, 2H, 19-H); 3,04 (s, 3H, 28-H); 3,86 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H, 10-H); 4,29 (m, 4H, 14-H, 16-H); 6,02 (s, 2H, 22-H).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 3,72; 10,08; 16,16; 26,89; 27,55; 28,04; 33,20; 37,51; 38,62; 38,74; 39,90; 45,48; 67,59; 68,26; 106,89; 147,47; 151,49; 154,42; 161,74; 176,99$.

MS (ESI): Exakte Masse: 524,23 g/mol; m/e 525,28 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100 %).

4.5 Radiosynthesen der [^{18}F]Fluorxanthinderivate

Produktion von trägerarmen (n.c.a.) [^{18}F]Fluorid

Die Produktion des für die Radiofluorierung verwendeten n.c.a. [^{18}F]Fluorids erfolgte am JWS Babyzyklotron BC 1710 des Instituts für Neurowissenschaften und Medizin (INM-5) des Forschungszentrums Jülich durch Bestrahlung von > 95 % ^{18}O -angereichertem Wasser mit 16,5 MeV Protonen über die $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ Kernreaktion. Das so hergestellte n.c.a. [^{18}F]Fluorid wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Azeotrope Trocknung des n.c.a. [^{18}F]Fluorids

Es wurden eine 79,6 mM wässrige Kaliumcarbonat-Lösung sowie eine Lösung aus 39,84 mmol Kryptofix 2.2.2. in Acetonitril hergestellt.

Zur Trocknung des n.c.a. [^{18}F]Fluorids wurden 75 μL (6 μmol) der Kaliumcarbonat-Lösung sowie 300 mL (12 μmol) der Kryptofix 2.2.2.-Lösung zusammen mit der wässrigen [^{18}F]Fluorid-Lösung in einen 5 mL Rundkolben gegeben und gemischt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 55 °C am Rotationsverdampfer bei einem Druck von 3 mbar bis zur Trockne eingeeengt. Nach Zugabe von 700 μL trockenem Acetonitril wurde erneute bis zur Trockne eingeeengt. Dieser Schritt der azeotropen Trocknung wurde ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurde für fünf Minuten bei einem Druck von 3 mbar weiter getrocknet.

Markierungsreaktionen mit n.c.a. [^{18}F]Fluorid und anschließende Entschützung

Zur Radiosynthese der Xanthinderivate **66** bzw. **67** mit n.c.a. [^{18}F]Fluorid wurde eine Lösung der jeweiligen Vorläuferverbindung **60** bzw. **61** (3,5 μmol in 250 μL Dimethylsulfoxid) in das Reaktionsgefäß zu der getrockneten ^{18}F -Aktivität gegeben. Das Gefäß wurde mit einem Stopfen dicht verschlossen und in einem Ölbad erhitzt, wobei die Temperatur in den jeweiligen Versuchen variiert wurde. Nach 5-30 Minuten wurden 100 μL einer 1 N Natriumhydroxidlösung zugegeben. Es wurde zwei Minuten reagieren gelassen und anschließend 200 μL konzentrierte Essigsäure zugefügt.

Festphasenextraktion und HPLC-Abtrennung

Die Reaktionsmischung wurde mit 1 mL Wasser verdünnt und in eine 5 mL fassende Einwegspritze gezogen. Das Reaktionsgefäß wurde mit 1 mL Wasser gespült, welches

ebenfalls in die Spritze mit der Aktivität gezogen wurde. Die Mischung wurde über eine mit 10 mL Methanol und 10 mL Wasser konditionierte SepPak[®] C18 Plus-Kartusche gegeben. Daraufhin wurde die Kartusche zur Entfernung der anorganischen Salze zweimal mit jeweils 1 mL und anschließend mit 0,5 mL Wasser gespült. Es wurden fünfmal jeweils 0,5 mL Ethanol durch die Kartusche gegeben, um die markierten fixierten Verbindungen zu eluieren. Die erste Fraktion wurde verworfen und die restlichen in einem 5 mL Rundkolben gesammelt. Das Ethanol wurde unter vermindertem Druck entfernt, anschließend wurde der Rückstand in 300 μ L des HPLC-Eluenten aufgenommen und zur Trennung auf die HPLC gegeben. Hierbei wurde Methanol/Wasser/Essigsäure (50/50/0,2, v/v/v) als Eluent bei einer Flussrate von 1 mL/min verwendet. Die Retentionsfaktoren der inaktiven Standards lagen bei $k = 23,76 \pm 0,32$ für **1** sowie $k = 42,82 \pm 0,9$ für **2** bei einer Totzeit von $2,34 \pm 0,01$ Minuten. Die Totzeit der HPLC-Anlage wurde in fünf Versuchen mittels Injektion von Thioharnstoff bestimmt.

Bestimmung der radiochemischen Ausbeuten

Zur Bestimmung der radiochemischen Ausbeute der Markierungsreaktionen wurden Aliquots zu je 5 μ L aus der Reaktionslösung entnommen und mit jeweils 25 μ L Ethanol verdünnt. Hiervon wurden je drei Spots von 2 μ L auf eine DC-Platte gegeben. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches nach der Markierungsreaktion wurde so mittels Radiodünnschichtchromatographie untersucht und die R_f -Werte mit denen der inaktiven Standards verglichen. Aus dem Verhältnissen der Integrale der Peaks des markierten geschützten Produkts, des entschützten Produkts sowie des [¹⁸F]Fluorids zu der kompletten Aktivität wurden die DC-Ausbeuten erhalten. Um das Auftreten flüchtiger Substanzen zu überprüfen, wurden auf die DC-Platten nach der Entwicklung Referenzspots von Proben der Reaktionslösung gegeben.

Als Laufmittel für die radiodünnschichtchromatographischen Untersuchungen diene eine Mischung aus Hexan und Essigsäureethylester im Verhältnis 60:40 bei Verwendung von Kieselgel als stationäre Phase. Die R_f -Werte der inaktiven Standards lagen bei 0,69 für **56** sowie bei 0,34 für **1** bzw. bei 0,92 für **57** und 0,78 für **2**.

Zur Bestimmung der radiochemischen Ausbeute der Endprodukte in Prozentangaben wurde der entsprechende Peak der HPLC-Trennung in einem Reaktionsgefäß aufgefangen, die Aktivität gemessen, zerfallskorrigiert und mit einer volumenkorrigierten Menge der Startaktivität verglichen, um Verluste durch die Markierungsreaktion, der Kartuschenabtrennung sowie der Entfernung des Elutionsmittels zu erfassen.

Bestimmung der molaren Aktivität

Zur Bestimmung der molaren Aktivität der ^{18}F -markierten Produkte wurden zunächst Verdünnungsreihen der beiden Standards **1** und **2** angesetzt und die UV-Signale ihrer HPLC-Trennungen in Abhängigkeit von der eingesetzten Stoffmenge ermittelt. Hieraus wurden Kalibrationsgeraden erstellt, über die aus den UV-Signalen der radiofluorierten Produkte deren entsprechenden Stoffmengen ermittelt werden konnten. Diese wurden mit den Aktivitäten der über die HPLC abgetrennten Peaks nach Gleichung 1 (vgl. Kapitel 1.1) verrechnet. Hierbei wurde die Aktivität der abgetrennten Lösung durch die ermittelte Stoffmenge dividiert, um so die molare Aktivität in GBq/ μmol zu erhalten.

Abbildung 35 zeigt die Abhängigkeit der Peakfläche des UV-Signals von der eingesetzten Stoffmenge an **1**. Über eine lineare Geradenanpassung der Form $y = mx + b$ durch den Ursprung konnte die Steigung der Geraden zu $m = 290,2 \pm 1,7 \text{ VE/nmol}$ bestimmt werden.

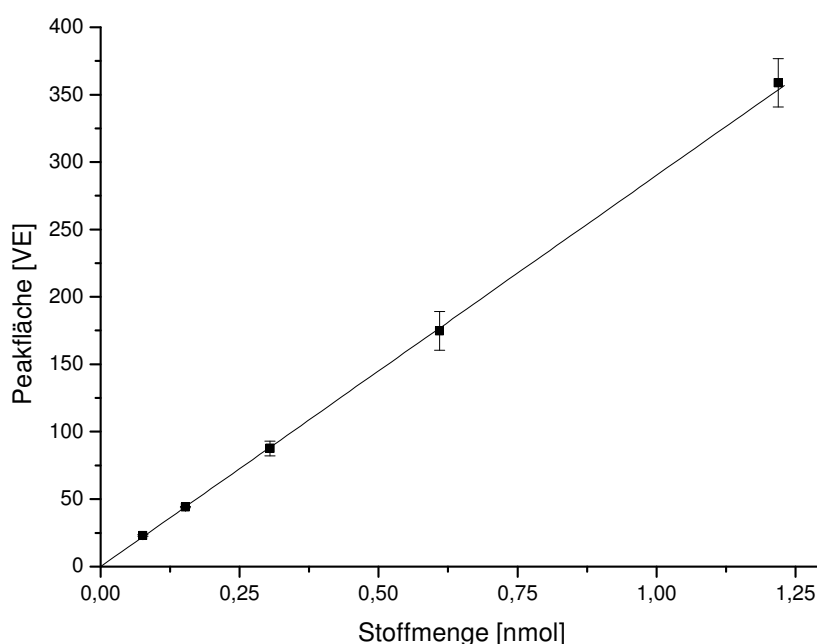


Abbildung 35: Abhängigkeit der Peakfläche des UV-Signals von der Stoffmenge von **1** bei der HPLC-Trennung.

In Abbildung 36 ist entsprechend die Peakfläche des UV-Signals in Abhängigkeit von der Stoffmenge an **2** zu sehen. Hier wurde über die lineare Geradenanpassung durch den Ursprung die Steigung der Geraden zu $m = 278,7 \pm 3,4 \text{ VE/nmol}$ bestimmt.

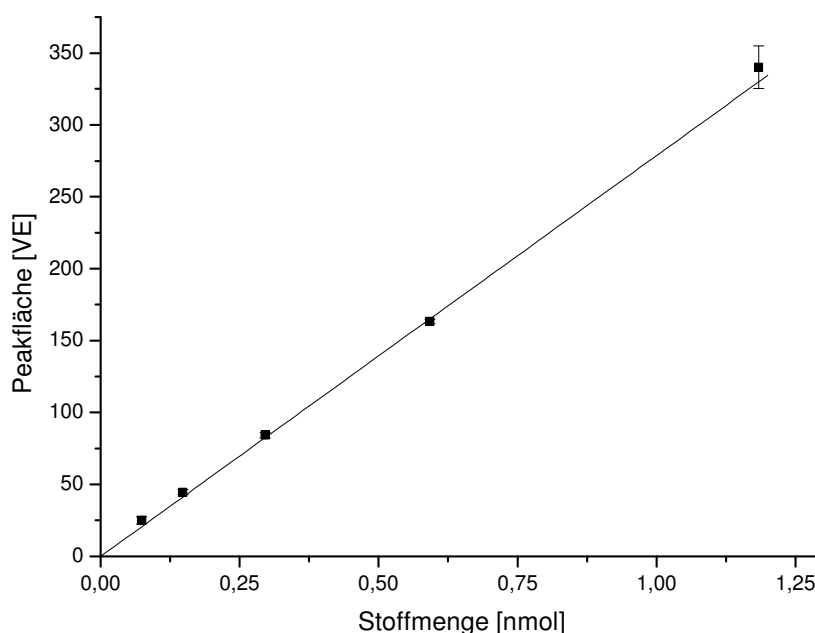


Abbildung 36: Abhängigkeit der Peakfläche des UV-Signals von der Stoffmenge von **2** bei der HPLC-Trennung

4.6 Metabolismusstudien der Xanthinderivate

Für die Durchführung der Metabolismusstudien wurden humane Lebermikrosomen verwendet.

In einem 1,5 mL fassendem Eppendorfvial wurden zu 40 μL einer Mikrosomenlösung bestehend aus humanen Lebermikrosomen (Proteinmenge: 0,8 mg) nacheinander 759 μL 0,1 M Natriumphosphat-Pufferlösung ($\text{pH} = 7,4$), Magnesiumdichlorid-Lösung, NADP-Lösung, Glukose-6-Phosphat-Lösung, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Lösung sowie 3 μg der zu untersuchenden Substanz in DMSO zugegeben. Die entsprechenden Konzentrationen der einzelnen Substanzen in der Versuchsmischung sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Das Reaktionsgemisch wurde bei 37 °C in einem Thermomixer mit 300 rpm gerüttelt. Zu verschiedenen Zeiten wurden Aliquots zu je 75 μL aus der Mischung entnommen und zu 75 μL Acetonitril gegeben. Es wurde für eine Minute auf einem Vortexer vermischt und anschließend für zwei Minuten bei 20.000 $\times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein anderes Eppendorfvial überführt. Von diesem wurden jeweils 100 μL zur Messung der UV-

Intensität in die HPLC überführt. Als Eluens diente Methanol/Wasser/Essigsäure (50/50/0,2, v/v/v) für die Messungen von **1** bzw. Methanol/Wasser/Essigsäure (55/45/0,2, v/v/v) für diejenigen von **2** und CPFPX.

Tabelle 9: Konzentrationen der einzelnen Substanzen bei der Durchführung der Metabolismusstudien.

Substanz	Konzentration im Assay
humane Lebermikrosomen	0,8 mg/mL
Magnesiumdichlorid	3,3 mM
NADP	1,3 mM
Glukose-6-Phosphat	3,3 mM
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	0,4 U
Xanthinderivat	3 µg/mL

4.7 Autoradiographische Untersuchungen der [^{18}F]Fluorxanthine

Die autoradiographischen Untersuchungen wurden von der Radiopharmakologiegruppe des INM-5 (Institut für Nuklearchemie) des Forschungszentrums Jülich GmbH durchgeführt. Sie sollen zur Vollständigkeit jedoch hier kurz skizziert werden.

Für die Gewebeverteilungsstudien der radiofluorierten Xanthinderivate wurden horizontale Rattenhirnschnitte eines tiefgefrorenen Rattengehirns verwendet, welche mit Hilfe eines Gefriermikrotoms auf eine Dicke von 20 µm geschnitten und für die weitere Verwendung bei -80 °C gelagert wurden.

Es wurden jeweils acht dieser Rattenhirnschnitte aufgetaut und trocknen gelassen. Nach fünfminütiger Vorinkubation in 50 mM Tris-HCl Pufferlösung (pH = 7,4) wurden jeweils vier dieser Schnitte zur Hauptinkubation (60 Minuten) in ein Gefäß mit je 16 mL der Pufferlösung gegeben und mit einigen Mikrolitern der nach der HPLC-Trennung aufgefangenen radioaktiv markierten Produkte **66** bzw. **67** versetzt. Dabei betrug die Gesamtaktivität in jedem der Gefäße etwa 100 kBq. In ein Gefäß wurden zusätzlich nicht radioaktives DPCPX zum Blockieren der Bindungsstellen der Adenosin A₁-Rezeptoren hinzugegeben. Die Konzentration dieses Liganden in der Pufferlösung betrug 1 µmol/L.

Die Schnitte wurden zweimal für jeweils eine Minute in der Pufferlösung gewaschen und anschließend kurz in entsalztes Wasser getaucht. Nachdem diese für 45 Minuten bei 37 °C getrocknet wurden, wurden sie auf Trägern fixiert, für 30 Minuten auf einer Phosphor Imager Platten exponiert und an einem Phosphor Imager BAS-Reader ausgelesen.

5 Zusammenfassung

Adenosinrezeptoren besitzen aufgrund ihrer neuroprotektiven Eigenschaften eine wichtige Rolle im zentralen Nervensystem (ZNS). Eine Änderung in der Rezeptordichte der Adenosin A₁-Rezeptoren wird als eine mögliche Ursache verschiedener neurologischer und neurodegenerativer Krankheiten wie Alzheimer oder Epilepsie diskutiert. Hier bietet sich über die Darstellung von radioaktiv markierten A₁-Rezeptorantagonisten die Möglichkeit, die entsprechenden Rezeptoren *in vivo* zu lokalisieren sowie deren Rezeptordichten zu bestimmen, um einen möglichen Zusammenhang mit den Erkrankungen zu erkennen und diese über Bildgebung mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) diagnostizieren zu können.

Mit dem 8-Cyclopentyl-3-(3-[¹⁸F]fluorpropyl)-1-propylxanthin ([¹⁸F]CPFPX) konnte ein hochaffiner und selektiver Adenosin A₁-Rezeptorantagonist für *in vivo* Studien entwickelt werden. Er stellt einen etablierten Radioliganden für die PET zur quantitativen Untersuchung der Adenosin A₁-Rezeptoren im ZNS dar und wird bereits routinemäßig in der Schlafforschung sowie in der klinischen Forschung angewendet. Ein großer Nachteil dieser Verbindung ist jedoch sein schneller Metabolismus *in vivo*, der zu einer sehr geringen biologischen Halbwertszeit im menschlichen Blutplasma von etwa 10 Minuten führt.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, einen ähnlich affinen und selektiven Antagonisten für den Adenosin A₁-Rezeptor zu entwickeln, welcher hinsichtlich der *in vivo* Stabilität bessere metabolische Eigenschaften besitzt. Somit wären aufgrund der größeren biologischen Halbwertszeit im Körper ausgedehntere Studien mittels PET möglich.

Zur Auswahl neuer potentiell affiner und selektiver Adenosin A₁-Rezeptorliganden wurden die Bindungseigenschaften unterschiedlicher schon früher im Haus dargestellter Xanthinderivate an einer CHO#38b-Zelllinie, welche den humanen Adenosin A₁-Rezeptor exprimiert, untersucht. Durch Optimierungsversuche konnten die hierzu nötige Proteinmenge zu 20 µg pro Messpunkt, die benötigte Inkubationszeit mit 35 Minuten sowie die zur Abtrennung des auf den Gelstreifen haftenden Kompetitors nötige Waschzeit mit 60 Sekunden bestimmt werden. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante des für die Bindungsexperimente verwendeten tritierten 1,3-Dipropyl-8-cyclopropylxanthins ([³H]DPCPX) wurde über entsprechende Sättigungsexperimente mit $K_D = 2,47 \pm 0,27$ nM ermittelt. Über Kompetitionsexperimente ließ sich zeigen, dass der K_i-Wert der Bindung am Adenosin A₁-Rezeptor der getesteten Verbindungen keine Abhängigkeit zum logP-Wert oder zur molaren Masse der Testsubstanzen aufweist.

Sauerstoffbrücken in einer der beiden Alkylketten in 1- oder 3-Position des Xanthins verschlechterten den K_i -Wert jedoch um mehr als eine Größenordnung. Mit steigendem Volumen der Cycloalkylreste in der 8-Position hingegen stieg die Affinität der Verbindungen zum A_1 -Rezeptor. Zur Erhaltung einer hohen Affinität sollte die Fluorfunktionalität analog zum CFPX in der Position 3 eingeführt werden. Den geringsten K_i -Wert und die damit verbundene höchste Affinität der früher im Haus dargestellten und untersuchten Xanthinderivate besaßen das 1-Norbornyl- (1NBX) und das 7-Norbornylxanthinderivat (7NBX) mit 6,30 bzw. 6,91 nM. Die Dissoziationskonstante des bereits in radiofluorierter Form für PET-Studien verwendeten Adenosinrezeptorliganden CFPX betrug im Vergleich bei der in dieser Arbeit eingesetzten Messmethode 15,1 nM.

Für die bereits bei den Kompetitionsassays verwendeten Xanthinderivate waren die mittleren effektiven Konzentrationen (EC_{50} -Werte) über einen kommerziell erhältlichen cAMP-Glo™ Assay der Firma Promega in Hinblick auf ihre Wirkung auf den Rezeptor zu bestimmen. So sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der Affinität und der Funktionalität von Xanthinderivaten zum A_1 -Rezeptor untersucht und Aussagen zur Brauchbarkeit dieser Untersuchungsmethode für die Rezeptorligandenevaluierung getroffen werden. Zur Validierung des Assays in Hinblick auf die benötigte Zellzahl, die Ligandenkonzentration sowie die Inkubationszeit wurden Versuche mit dem A_{2A} -spezifischen Agonisten CGS 21860 an Zellen einer PC-12-Zelllinie, welche den Adenosin A_{2A} -Rezeptor exprimiert, durchgeführt. Es konnten jedoch keine aussagekräftigen Dosis-Wirkungs-Kurven erhalten werden.

Weitere Versuche folgten daher mit der CHOB#19-Zelllinie (A_{2A} -Adenosinrezeptor). Die daran ermittelte effektive Konzentration von CGS 21860 betrug $EC_{50} = 28,7 \mu\text{M}$. Zur Übertragung der Ergebnisse auf Adenosin A_1 -Rezeptor-exprimierende Zellen wurden zunächst Versuche mit Forskolin und anschließend aufgrund dessen schlechter Löslichkeit in polaren Medien mit seinem Derivat NKH 477 durchgeführt. Nach einigen Optimierungsversuchen konnte für dieses ein EC_{50} -Wert von $22,9 \mu\text{M}$ erhalten werden. Die so erhaltenen Ergebnisse ließen sich problemlos auf Zellen der CHO#38b-Zelllinie, welche den Adenosin A_1 -Rezeptor exprimieren und bereits für die Bindungsstudien verwendet wurden, übertragen. Hiermit konnte eine mittlere effektive Konzentration von $EC_{50} = 46,2 \mu\text{M}$ ermittelt werden.

Zur Bestimmung des EC_{50} -Werts des selektiven Adenosin A_1 -Rezeptorliganden DCPX an den CHOB#38-Zellen wurde zunächst eine Änderung in der cAMP-Produktion mit dem Agonisten NKH 477 induziert, um die Auswirkung des Antagonisten auf die Aktivierung des GPCR zu untersuchen. Hierbei konnte jedoch auch nach mehreren Validierungsversuchen kein eindeutiger Effekt auf resultierende Lumineszenzsignale festgestellt werden. Versuche mit dem NKH 477 an Zellen der CHO WT-Zelllinie haben durch ihre große Dynamik gezeigt,

dass der Anteil der A₁-Rezeptoren im Vergleich zu dem der AC, welche durch den Agonisten aktiviert wird, vermutlich zu gering ist und der Effekt des DPCPX daher nicht zu erkennen ist. Eine anschließende Untersuchung der cAMP-Produktion in Abhängigkeit vom adenosinspezifischen Agonisten NECA an Wildtyp-Zellen zeigte wie erwartet eine deutlich geringere Dynamik des Assays. Der Anstieg der Lumineszenz mit der Ligandenkonzentration spricht hier für einen großen Anteil an A₁- im Vergleich zu anderen Adenosinrezeptoren. An Zellen der CHO#38b-Zelllinie zeigte NECA auch nach Ausweitung des Konzentrationsbereichs des Agonisten ähnliche Kurvenverläufe mit unerwartet hohen EC₅₀-Werten. Bei kleineren Ligandenkonzentrationen ab 1 µM kam es zu Schwankungen in den Lumineszenzsignalen. Diese ließen vermuten, dass die eigentliche effektive Konzentration innerhalb dieses Bereichs liegt, der Effekt auf die cAMP-Produktion jedoch nicht groß genug für eine ausreichende Dynamik des Assays ist. Durch eine zusätzliche Gabe von Natriumbutyrat zu den Zellen, um die Rezeptorexpressionsrate und damit die Dynamik des Assays zu steigern, wurden ebenfalls keine aussagekräftigen Ergebnisse erhalten. Daher wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, um die Nutzbarkeit dieses Assays grundlegend für das Adenosinrezeptorsystem zu klären. Die dabei erhaltenen Ergebnisse entsprachen nicht den Erwartungen. Somit scheint der cAMP-Glo™ Assay nicht zur Untersuchung der Funktionalitäten dieser Adenosinrezeptoren an den verwendeten Zelllinien geeignet zu sein.

Auf Grundlage der Ergebnisse aus den Kompetitionsversuchen, von im Haus durchgeführten Metabolismusstudien und in der Literatur beschriebenen Eigenschaften sowie der computer-gestützten Bestimmung der logP-Werte verschiedener Xanthinderivate wurden neue Verbindungen als mögliche Adenosin A₁-Rezeptorliganden konzipiert. Zu deren Synthese wurde ein orthogonales Schutzgruppensystem erarbeitet, um möglichst viele Derivate über eine universelle Zwischenverbindung durch Entschützung und anschließender Substitutionen in den Positionen 1 und 3 darstellen zu können, ohne für die einzelnen Verbindungen einen gesamten Syntheseweg über 13 Stufen durchführen zu müssen.

Nachdem die Darstellung eines orthogonal geschützten Xanthinderivats über verschiedene Schutzgruppensysteme (Phenylallyl-/DMB-/POM-; TCBOC-/DMB-/POM-; MOM-/BOM-/POM-; TCBOC-/BOM-/POM-) jedoch zu keinem Erfolg führte, wurde dieses Prinzip verworfen. So wurden das 8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(3-fluorpropyl)xanthin (CBCPM) sowie das 1-Cyclopropylmethyl-3-(3-fluorpropyl)-8-(1-methylcyclobutyl)xanthin (CPMMCB) als besonders aussichtsreiche Kandidaten auf klassischem Weg synthetisiert. Sie konnten in jeweils 13 Stufen ausgehend von 2,4-Dimethoxybenzylamin mit Gesamtausbeuten von 1,8 % (CBCPM) bzw. 1,5 % (CPMMCB) dargestellt werden. Die Synthese der für die Radiofluorierungen verwendeten Mesylatvorläuferverbindungen erfolgte ebenfalls aus-

gehend von 2,4-Dimethoxybenzylamin in jeweils 13 Stufen mit Gesamtausbeuten von 0,8 % im Fall des 8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(3-methylsulfonyloxypropyl)-7-pivaloyloxymethylxanthins sowie 1,1 % beim 1-Cyclopropylmethyl-8-(1-methylcyclobutyl)-3-(3-methylsulfonyloxypropyl)-7-pivaloyloxymethylxanthin.

Ein Vorteil dieses linearen Synthesewegs ist die Möglichkeit, über die versatile Zwischenverbindung 3-Cyclopropylmethyl-5,6-diamino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)uracil in der 3-, 7- und 8-Position beliebig substituierbare Xanthinderivate darzustellen, ohne erneute vollständige Synthesen über alle Stufen durchführen zu müssen. Ebenso können über diese Zwischenstufe die Vorläuferverbindungen für die jeweiligen Radiosynthesen synthetisiert werden. Eine orthogonale Verbindung mit der Möglichkeit zur Variation des Alkylsubstituenten in der Position 1, um eine größere Anzahl an Derivaten ohne größeren Aufwand darstellen zu können, konnte auf diesem Weg jedoch nicht erreicht werden.

Nach Optimierung der Radiofluorierung des 8-Cyclobutyl-1-cyclopropylmethyl-3-(3-methylsulfonyloxypropyl)-7-pivaloyloxymethylxanthins zum 3-(3-[^{18}F]Fluorpropyl)derivat konnten radiochemische Ausbeuten von $46,5 \pm 1,0$ % nach fünf Minuten bei einer Reaktionstemperatur von $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhalten werden, wobei das Markierungsprodukt bereits teilweise zum entschützten Produkt umgewandelt wurde. Die Radiofluorierung des 1-Cyclopropylmethyl-8-(1-methylcyclobutyl)-3-(3-methylsulfonyloxypropyl)-7-pivaloyloxymethylxanthins gelang unter den oben genannten Bedingungen mit einer radiochemischen Ausbeute von $32,5 \pm 0,3$ %; ebenfalls unter Einberechnung des bereits umgewandelten Anteils.

Nach Entschützung der Markierungsprodukte mittels Base und anschließender Festphasenextraktion wurden sowohl das [^{18}F]CBCPM als auch das [^{18}F]CPMMCB über HPLC sauber isoliert. Sowohl im Radioaktivkanal als auch im UV-Kanal wurden keine Verunreinigungen nachgewiesen. Das [^{18}F]CBCPM wurde hierbei mit einer radiochemischen Ausbeute von $21,3 \pm 3,8$ % und einer molaren Aktivität von mehr als $12,3 \pm 0,19$ GBq/ μmol ($0,33 \pm 0,01$ Ci/ μmol) erhalten. Die Synthese des [^{18}F]CPMMCB gelang mit einer radiochemischen Ausbeute von $14,4 \pm 2,5$ % und einer molaren Aktivität von $36,5 \pm 1,1$ GBq/ μmol ($0,99 \pm 0,03$ Ci/ μmol). Trotz der hohen Verluste durch die Hydrolyse und Aufreinigung der Produkte standen die Radioliganden in ausreichendem Maße für präklinische Studien zur Verfügung.

Zur präklinischen Evaluierung des CBCPM und des CPMMCB wurden über Kompetitionsexperimente die Bindungsdissoziationskonstanten dieser beiden Verbindungen bestimmt. Beide weisen eine hohe Affinität zum Adenosin A_1 -Rezeptor auf. Das CPMMCB besitzt

hierbei einen K_i -Wert von 10,1 nM, damit eine höhere Affinität zu diesem Rezeptor als das CPFPX ($K_i = 15,1$ nM), und das CBMCP mit $K_i = 15,5$ nM eine vergleichbar hohe.

Zur genaueren Analyse der Affinität sowie zur Bestimmung der Selektivität der Xanthinderivate wurden autoradiographische *in vitro* Untersuchungen beider radiofluorierter Verbindungen an horizontalen Rattenhirnschnitten durchgeführt. Sie zeigten beide analog dem [3 H]DPCPX und dem [18 F]CPFPX deutliche und selektive Anreicherungen im Hippocampus, Thalamus sowie im Cerebellum, also in Hirnregionen, in denen der Adenosin A_1 -Rezeptor typischerweise stark exprimiert ist. In beiden Fällen fand eine Verdrängung des Radioliganden von den Bindungsstellen durch den hoch affinen und selektiven Adenosin A_1 -Rezeptorantagonisten DPCPX statt. Der Anteil der spezifischen Bindung ist für beide Derivate sehr hoch, er beträgt 86,8 % im Fall des [18 F]CBCPM sowie 84,8 % beim [18 F]CPMMCB. Die eingesetzten Ligandenkonzentrationen betrugen bei diesen Studien 4,07 pM (CBCPM) bzw. 1,37 pM (CPMMCB). Die geringen unspezifischen Bindungen sprechen sowohl für hohe Selektivitäten, als auch für hohe spezifische Aktivitäten des [18 F]CBCPM und des [18 F]CPMMCB. Die spezifische Bindung des [18 F]CPFPX beträgt unter vergleichbaren Bedingungen 94,1 %. Diese Verbindung besaß jedoch eine höhere molare Aktivität, welche über die dadurch eingesetzte geringere Konzentration bei dieser Studie zu einem geringeren Anteil an unspezifischer Bindung führte.

Über *in vitro* Metabolismusstudien wurde der Abbau von CBCPM und CPMMCB durch humane Lebermikrosomen mit dem des CPFPX verglichen. Beide Verbindungen zeigten eine deutlich höhere metabolische Stabilität. Die relative Menge des nach 30 bzw. 60 Minuten noch vorhandenen CBCPM betrug das 1,5- bis 1,4-fache des zu diesem Zeitpunkt noch verbleibenden CPFPX. Die relative Menge des CPMMCB war mit dem 1,7- bis 2,1-fachen von derjenigen des CPFPX noch größer. Somit konnten mit CBCPM und CPMMCB zwei Xanthinderivate mit stabileren metabolischen Eigenschaften als denen des CPFPX dargestellt werden. Ob diese auch tatsächlich eine größere biologische Halbwertszeit *in vivo* besitzen, muss durch entsprechende weitergehende Untersuchungen geprüft werden.

Somit ist es gelungen, mit den zwei radiofluorierten Xanthinderivaten [18 F]CBCPM und [18 F]CPMMCB potentielle Radioliganden des Adenosin A_1 -Rezeptors zur molekularen Bildgebung mittels PET darzustellen. Beide besitzen ebenso affine und selektive Eigenschaften wie das bereits in der klinischen Forschung und in der Schlafforschung angewendete [18 F]CPFPX. Darüber hinaus weisen die Metabolismusstudien auf eine größere *in vivo* Stabilität und eine damit verbundene angestrebte längere biologische Halbwertszeit im Körper des Menschen hin.

6 Literatur

- [1] H. H. Coenen, Radiopharmazeutische Chemie: Grundlagen zur *in vivo* Untersuchung molekularer Vorgänge mit PET, *Der Nuklearmediziner*, **1994**, 17, 203-214.
- [2] S. M. Qaim, H. H. Coenen, Produktion pharmazeutisch relevanter Radionuklide, *Pharm. unserer Zeit*, **2005**, 34, 460 - 466.
- [3] S. M. Qaim, Therapeutic radionuclides and nuclear data, *Radiochim. Acta*, **2001**, 89, 297-302.
- [4] G. Kramer-Marek, J. Capala, The role of nuclear medicine in modern therapy of cancer, *Tumor Biol.*, **2012**, 33, 629-640.
- [5] H. Herzog, F. Rösch, Chemie und Physik der Bildgebung: PET- und SPECT-Technik, *Pharm. unserer Zeit*, **2005**, 34, 468-473.
- [6] H. H. Coenen, Fluorine-18 Labeling Methods, in *PET Chemistry, The Driving Force in Molecular Imaging*, P. A. Schubiger, L. Lehmann, M. Friebe (Eds.), Springer Verlag, **2007**, 16-50.
- [7] G. Stöcklin, Spezielle Syntheseverfahren mit kurzlebigen Radionukliden und Qualitätskontrolle, in *Nuklearmedizin Teil 1B, Emissions-Computer-Tomographie mit kurzlebigen Zyklotron-produzierten Radiopharmaka*, J. Fitschen, F. Helus, K. Jordan, D. Junker, G.-J. Meyer, O. Schober, G. Stöcklin, H. Hundeshagen (Eds.), Springer Verlag **1988**, 31-117.
- [8] F. Dollé, D. Roeda, B. Kuhnast, M.-C. Lasne, Fluorine-18 Chemistry for Molecular Imaging with Positron Emission Tomography, in *Fluorine and Health*, G. H. A. Tressaud (Eds.), Elsevier, **2008**, 3-65.
- [9] H. H. Coenen, No-carrier-added ^{18}F -chemistry of radiopharmaceuticals, in *Synthesis and applications of isotopically labeled compounds*, J. R. J. T. A. Baillie (Eds.), Elsevier, **1988**, 443-448.
- [10] L. F. Mausner, S. Mirzadeh, Reactor production of radionuclides, in *Handbook of Radiopharmaceuticals – Radiochemistry and Applications*, M. J. Welch, C. S. Redvanly (Eds.), John Wiley & Sons, Chichester, **2003**, 86-118.
- [11] S. M. Qaim, J. C. Clark, C. Crouzel, M. Guillaume, H. J. Helmeke, B. Nebeling, V. W. Pike, G. Stöcklin, in *Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography, PET radionuclide production*, (Eds.), Kluwer Academic Publishers, **1993**, 1-43.
- [12] G. Blessing, H. H. Coenen, K. Franken, S. M. Qaim, Production of $[\text{}^{18}\text{F}]\text{F}_2$, H^{18}F and $^{18}\text{F}^-_{\text{aq}}$ using the $^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$ Process, *Appl. Radiat. Isot.*, **1986**, 37, 1135-1139.
- [13] E. Hess, G. Blessing, H. H. Coenen, S. M. Qaim, Improved target system for production of high purity $[\text{}^{18}\text{F}]\text{fluorine}$ via the $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ reaction, *Appl. Radiat. Isot.*, **2000**, 52, 1431-1440.
- [14] J. Bergmann, O. Solin, Fluorine-18-Labeled Fluorine Gas for Synthesis of Tracer Molecules, *Nucl. Med. Biol.*, **1997**, 24, 677-683.

-
- [15] G. Balz, G. Schiemann, Über aromatische Fluorverbindungen, I.: Ein neues Verfahren zu ihrer Darstellung, *Chem. Ber.*, **1927**, 60, 1186-1190.
- [16] H. L. Atkins, D. R. Christman, J. S. Fowler, W. Hauser, R. Hoyte, R. J. Klopper, S. S. Lin, A. P. Wolf, Organic radiopharmaceuticals labeled with isotopes of short half-life. V. ^{18}F -labeled 5- and 6-fluorotryptophan, *J. Nucl. Med.*, **1972**, 13, 713-719.
- [17] B. Långström, T. Kihlberg, M. Bergström, G. Antoni, M. Björkman, B. H. Forngren, T. Forngren, P. Hartvig, K. Markides, U. Yngve, M. Ögren, Compounds Labelled with Short-Lived β^+ -Emitting Radionuclides and Some Applications in Live Sciences. The Importance of Time as a Parameter, *Acta Chem. Scand.*, **1999**, 53, 651-669.
- [18] C.-N. W. T. Ido, V. Casela, J. S. Fowler, S. P. Wolf, M. Reivich, D. E. Kuhl, Labeled 2-Deoxy-D-Glucose Analogs. ^{18}F -Labeled 2-Deoxy-2-Fluoro-D-Glucose, 2-Deoxy-2-Fluoro-D-Mannose and ^{14}C -2-Deoxy-2-Fluoro-D-Glucose, *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **1978**, 14, 175-182.
- [19] K. Hamacher, H. H. Coenen, G. Stöcklin, Efficient Stereospecific Synthesis of No-Carrier-Added 2- ^{18}F Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose Using Aminopolyether Supported Nucleophilic Substitution, *J. Nucl. Med.*, **1986**, 27, 235-238.
- [20] G. W. M. Visser, C. N. M. Bakker, J. D. M. Herscheid, G. Brinkman, A. Hoekstra, The chemical properties of ^{18}F -Acetylhypofluorite in acetic acid solution, *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **1984**, 21, 1226.
- [21] R. Chirakal, G. Firnau, G. J. Schrobilgen, J. McKay, E. S. Garnett, The Synthesis of ^{18}F Xenon Difluoride from ^{18}F Fluorine Gas, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, **1984**, 35, 401-404.
- [22] H. H. Coenen, B. Klatte, A. Knöchel, M. Schüller, G. Stöcklin, Preparation of n.c.a. 17- ^{18}F -Fluoroheptadecanoic acid in high yields via aminopolyether supported, nucleophilic fluorination, *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **1986**, 23, 455-466.
- [23] L. Cai, S. Lu, V. W. Pike, Chemistry with ^{18}F Fluoride Ion, *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, 17, 2853-2873.
- [24] D. Block, B. Klatte, A. Knöchel, R. Beckmann, U. Holm, N.c.a. ^{18}F -labelling of aliphatic compounds in high yields via aminopolyether – supported nucleophilic substitution, *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **1986**, 23, 467.
- [25] H. H. Coenen, J. Ermert, Direct Nucleophilic ^{18}F -Fluorination of Electron Rich Arenes: Present Limits of No-Carrier-Added Reactions, *Current Radiopharm.*, **2010**, 3, 163-173.
- [26] J. Ermert, H. H. Coenen, No-Carrier-Added ^{18}F Fluorobenzene Derivates as Intermediates for Built-up Radiosyntheses, *Current Radiopharm.*, **2010**, 2, 127-160.
- [27] D. Block, H. H. Coenen, G. Stöcklin, N.c.a. ^{18}F -fluoroalkylation of H-acidic compounds, *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **1988**, 25, 201-216.

- [28] D. Block, H. H. Coenen, G. Stöcklin, N.c.a. ^{18}F -Fluoroacylation via Fluorocarboxylic Acid Esters, *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **1988**, 25, 201-216.
- [29] Y. Shai, K. L. Kirk, M. A. Channing, B. B. Dunn, M. A. Lesniak, R. C. Eastman, R. D. Finn, J. Roth, K. A. Jacobson, ^{18}F -Labeled Insulin: A Prosthetic Group Methodology for Incorporation of a Positron Emitter into Peptides and Proteins, *Biochem.*, **1989**, 28, 4801-4806.
- [30] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, Click-Chemie: diverse chemische Funktionalität mit einer Handvoll guter Reaktionen, *Angew. Chem.*, **2001**, 113, 2056-2075.
- [31] J. Marik, J. L. Sutcliffe, Click for PET: rapid preparation of [^{18}F]fluoropeptides using Cu^{I} catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition, *Tetrahedron Letters*, **2006**, 47, 6681-6684.
- [32] C. Mamat, T. Ramenda, F. R. Wuest, Recent Applications of Click Chemistry for the Synthesis of Radiotracers for Molecular Imaging, *Organic Chemistry*, **2009**, 6, 21-34.
- [33] C. E. Müller, T. Scior, Adenosine receptors and their modulators, *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, **1993**, 68, 77-111.
- [34] M. Williams, Adenosine: The prototypic Neuromodulator, *Neurochem. Int.*, **1989**, 14, 249-264.
- [35] P. G. Nell, B. Albrech-Küpper, The Adenosine A_1 Receptor and its Ligands, in *Progress in Medicinal Chemistry*, Vol. 47, G. Lawton, D. R. Witty (Eds.), Elsevier, **2009**.
- [36] T. M. Cabrere-Vera, J. Vanhauwe, T. O. Thomas, M. Medkova, A. Preininger, M. R. Mazzoni, H. E. Hamm, Insights into G Protein Structure, Function and Regulation, *Endocrine Reviews*, **2003**, 24, 765-781.
- [37] G. L. Stiles, D. T. Daly, R. A. Olsson, Characterization of the A_1 Adenosine Receptor-Adenylate Cyclase System of Cerebral Cortex Using an Agonist Photoaffinity Ligand *J. Neurochem.*, **1986**, 47, 1020-1025.
- [38] K. A. Jacobson, Z.-G. Gao, Adenosine receptors as therapeutic targets, *Nature Reviews: Drug Discovery*, **2006**, 5, 247-264.
- [39] C. E. Müller, A_1 -Adenosine receptor antagonists, *Exp. Opin. Ther. Patents*, **1997**, 7, 419-440.
- [40] P. G. Baraldi, B. Cacciari, R. Romagnoli, G. Spalluto, A_1 and A_3 adenosine receptor agonists: an overview, *Exp. Opin. Ther. Patents*, **1999**, 9, 515-527.
- [41] S.-A. Poulsen, R. J. Quinn, Adenosine Receptors: New Opportunities for Future Drugs, *Bioorg. Med. Chem.*, **1998**, 6, 619-641.
- [42] K. Ishiwata, Y. Kimura, E. F. J. de Vries, P. H. Elsinga, PET Tracers for Mapping Adenosine Receptors as Probes for Diagnosis of CNS Disorders, *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, **2007**, 7, 57-77.
- [43] M. Williams, M. F. Jarvis, Purinergic and Pyrimidinergic Receptors as Potential Drug Targets, *Biochem. Pharmacol.*, **2000**, 59, 1173-1185.

-
- [44] S. Hentschel, K. Nieber, A. Lewerenz, Z. Vissienon, Adenosin A₁- und A₃-Rezeptoren: Neuroprotektive Targets mit Perspektiven, *BIOforum*, **2002**, 4, 237-240.
- [45] J. Ulas, L. C. Brunner, L. Nguyer, C. W. Cotman, Reducing Density of Adenosine A₁ Receptors and Preserved Coupling of Adenosine A₁ Receptors to G Protein in Alzheimer Hippocampus: A Quantitative Autoradiographic Study, *Neuroscience*, **1993**, 52, 843-854.
- [46] M. Glass, R. L. M. Faull, J. Y. Bullock, K. Jansen, E. W. Mee, E. B. Walker, B. J. L. Synek, M. Dragunow, Loss of A₁ adenosine receptors in human temporal lobe epilepsy, *Brain Research*, **1996**, 710, 5 -68.
- [47] M. H. Holschbach, R. A. Olsson, Applications of Adenosine Receptor Ligands in Medical Imaging by Positron Emission Tomography, *Curr. Pharm. Des.*, **2002**, 8, 2345-2352.
- [48] C. E. Müller, K. A. Jacobson, Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs, *Biochemica et Biophysica Acta*, **2011**, 1808, 1290-1308.
- [49] H. Nagasawa, T. Araki, K. Kogure, Alternation of adenosine A₁ receptor binding in the post-ischaemic rat brain, *Neuroreport*, **1994**, 5, 1453-1456.
- [50] J. P. DiMarco, T. D. Sellers, B. B. Lerman, M. L. Greenberg, R. M. Berne, L. Belardinelli, Diagnostic and Therapeutic Use of Adenosine in Patients With Supraventricular Tachyarrhythmias, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **1985**, 6, 417-425.
- [51] A. H. Watt, Sick Sinus Syndrom: An Adenosine-Mediated Disease, *Lancet*, **1985**, 325, 789-788.
- [52] B. D. Bertolet, E. B. McMurtie, J. A. Hill, L. Belardinelli, Theophylline for the treatment of atrioventricular block after myocardial infarction, *Ann. Int. Med.*, **1995**, 123, 509-511.
- [53] C. E. Müller, K. A. Jacobson, Xanthines as Adenosine Receptor Antagonists, in *Methylxanthines*, B. B. Fredholm (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2011**, 152-199.
- [54] K. Ishiwata, R. Furuta, J.-I. Shimada, S.-I. Ishii, K. Endo, F. Suzuki, M. Senda, Synthesis and Preliminary Evaluation of [¹¹C]KF15372, a Selective Adenosine A₁ Antagonist, *Appl. Radiat. Isot.*, **1995**, 46, 1009-1013.
- [55] A. K. Dixon, A. K. Gubit, D. J. S. Sirinathsinghji, P. J. Richardson, T. C. Freeman, Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat, *British Journal of Pharmacology*, **1996**, 118, 1461-1468.
- [56] R. Furuta, K. Ishiwata, M. Kiyosawa, S.-I. Ishii, N. Saito, J. Shimada, K. Endo, F. Suzuki, M. Senda, Carbon-11-Labeled KF15372: A Potential Central Nervous System Adenosine A₁ Receptor Ligand, *J. Nucl. Med.*, **1996**, 37, 1203-1207.
- [57] T. Matsuya, H. Takamatsu, Y. Murakami, A. Noda, R. Ichise, Y. Awaga, S. Nishimura, Synthesis and evaluation of [¹¹C]FR194921 as a nonxanthine-type PET tracer for adenosine A₁ receptors in the brain, *Nuclear Medicine and Biology*, **2005**, 32, 837-844.

- [58] R. F. Bruns, J. H. Fergus, E. W. Badger, J. A. Bristol, L. A. Santoy, J. D. Hartman, S. J. Hays, C. C. Huang, Binding of the A₁-Selective Adenosine Antagonist 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine to Rat Brain Membranes, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **1987**, 335, 59-63.
- [59] M. J. Lohse, K.-N. Klotz, J. Lindenborn-Fotinos, M. Reddinton, U. Schwabe, R. A. Olsson, 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX) - A Selective High Affinity Antagonist Radioligand for A₁ Adenosin Receptors, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **1987**, 336, 204-210.
- [60] M. H. Holschbach, T. Fein, C. Krummeich, R. G. Lewis, W. Wutz, U. Schwabe, D. Unterlugauer, R. A. Olsson, A₁ Adenosine Receptor Antagonists as Ligands for Positron Emission Tomography (PET) and Single-Photon Emission Tomography (SPET), *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 555-563.
- [61] M. H. Holschbach, T. Fein, W. Wutz, C. Boy, M. Cremer, H. Mühlensiepen, K. Hamacher, R. G. Lewis, U. Schwabe, H.-W. Müller-Gärtner, H. H. Coenen, R. A. Olsson, Synthesis and Characterization of Radiolabeled Xanthines: New Antagonists for the A₁ Adenosine Receptor (A₁AR), *Drug Dev. Res.*, **1998**, 43, 70.
- [62] M. H. Holschbach, R. A. Olsson, D. Bier, W. Wutz, W. Sihver, M. Schüller, B. Palm, H. H. Coenen, Synthesis and Evaluation of No-Carrier-Added 8-Cyclopentyl-3-(3-[¹⁸F]fluoropropyl)-1-propylxanthine ([¹⁸F]CPFPX): A Potent and Selective A₁-Adenosin Receptor Antagonist for in Vivo Imaging, *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 5150-5156.
- [63] D. Elmenhorst, R. Basheer, R. W. McCarley, A. Bauer, Sleep deprivation increase A₁ adenosine receptor density in the rat brain, *Brain Research*, **2009**, 1258, 53-58.
- [64] D. Elmenhorst, P. T. Meyer, O. H. Winz, A. Matusch, J. Ermert, H. H. Coenen, R. Basheer, H. L. Haas, K. Zilles, A. Bauer, Sleep Deprivation Increases A₁ Adenosine Receptor Binding in the Human Brain: A Positron Emission Tomography Study, *Journal of Neuroscience*, **2009**, 27, 2410-2415.
- [65] A. Bauer, M. H. Holschbach, P. T. Meyer, C. Boy, H. Herzog, R. A. Olsson, H. H. Coenen, K. Zilles, In vivo imaging of adenosine A₁ receptors in the human brain with [¹⁸F]CPFPX and positron emission tomography, *Neuroimage*, **2003**, 19, 1760-1769.
- [66] D. Elmenhorst, P. T. Meyer, A. Matusch, O. H. Winz, A. Bauer, Caffeine Occupancy of Human Cerebral A₁ Adenosine Receptors: In Vivo Quantification with ¹⁸F-CPFPX and PET, *J. Nucl. Med.*, **2012**, 53, 1723-1729.
- [67] A. Matusch, C. Saft, D. Elmenhorst, P. H. Kraus, R. Gold, H.-P. Hartung, A. Bauer, Cross sectional PET study of cerebral adenosine A₁ receptors in premanifest and manifest Huntington's disease, **2014**.
- [68] P. T. Meyer, D. Bier, M. H. Holschbach, C. Boy, R. A. Olsson, H. H. Coenen, K. Zilles, A. Bauer, Quantification of Cerebral A₁ Adenosine Receptors in Humans using [¹⁸F]CPFPX and PET, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, **2004**, 24, 323-333.

-
- [69] P. T. Meyer, D. Elmenhorst, C. Boy, O. Winz, A. Matusch, K. Zilles, A. Bauer, Effect of aging on cerebral A₁ adenosine receptors: A [¹⁸F]CPFPX PET study in humans, *Neurobiology of Aging*, **2007**, *28*, 1914-1924.
- [70] D. Bier, M. H. Holschbach, W. Wutz, R. A. Olsson, H. H. Coenen, Metabolism of the A₁ Adenosine Receptor Positron Emission Tomography Ligand [¹⁸F]8-Cyclopentyl-3-(3-Fluoropropyl)-1-Propylxanthine ([¹⁸F]CPFPX) in Rodents and Humans, *Drug Metab Dispos.*, **2006**, *34*, 570-576.
- [71] H. Repke, C. Liebmann, *Membranrezeptoren und ihre Effektorsysteme*, VCH, Weinheim, **1987**.
- [72] G. Scatchard, The Attraction of Proteins for Small Molecules and Ions, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1949**, *51*, 660-672.
- [73] Y.-C. Cheng, W. H. Prusoff, Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction, *Biochemical Pharmacology*, **1973**, *22*, 3099-3108.
- [74] W. Thomsen, J. Frazer, D. Unett, Functional assays for screening GPCR targets, *Current Opinion in Biotechnology*, **2005**, *16*, 655-665.
- [75] E. Hawkins, J. J. Cali, S. Kin Sang Ho, M. A. O'Brien, R. Somberg, R. F. Bulleit, K. V. Wood, Luciferase-based assay, Patent *US20110081670 (A1)*, **2011**.
- [76] Promega Corporation, cAMP-Glo™ Assay, *Technical Bulletin*, **2009**, *5*, 1-25.
- [77] P. A. Iredale, S. P. H. Alexander, S. J. Hill, Coupling of a transfected human brain A₁ adenosine receptor in CHO-K1 cells to calcium mobilisation via a pertussis toxin-sensitive mechanism, *Br. J. Pharmacol.*, **1994**, *111*, 1252-1256.
- [78] K.-N. Klotz, J. Hessling, J. Hegler, C. Owman, B. Kull, B. B. Fredholm, M. J. Lohse, Comparative pharmacology of human adenosin receptor subtypes - characterization of stably transfected receptors in CHO cells, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **1998**, *357*, 1-9.
- [79] J. Hanoune, N. Defer, Regulation and Role of Adenylyl Cyclase Isoforms, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **2001**, *41*, 145-174.
- [80] M. Teifel, Transfektion von Säugerzellen, in *Gentechnische Methoden*, M. Jansohn, S. Rothhämel (Eds.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2012**.
- [81] R. H. Erickson, R. N. Hiner, S. W. Feeney, P. R. Blake, W. J. Rzeszutarski, R. P. Hicks, D. G. Costello, M. E. Abreu, 1,3,8-Trisubstituted Xanthines. Effects of Substitution Pattern upon Adenosine Receptor A₁/A₂ Affinity, *J. Med. Chem.*, **1991**, *34*, 1431-1435.
- [82] J. Shimada, F. Suzuki, H. Nonaka, I. Akio, 8-Polycycloalkyl-1,3-dipropylxanthines as Potent and Selective Antagonists for A₁-Adenosine Receptors, *J. Med. Chem.*, **1992**, *35*, 924-930.
- [83] R. F. Bruns, J. W. Daly, S. H. Snyder, Adenosine receptor binding: Structure-activity analysis generates extremely potent xanthine antagonists, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1983**, *80*, 2077-2080.

- [84] J. W. Daly, W. Padgett, M. T. Shamim, Analogues of 1,3-Dipropyl-8-phenylxanthine: Enhancement of Selectivity at A₁-Adenosine Receptors by Aryl Substituents *J. Med. Chem.*, **1986**, 29, 1520.
- [85] K. A. Jacobson, R. De La Cruz, R. Schulick, L. Kiriasis, W. Padgett, W. Pfeleiderer, K. L. Kirk, J. L. Neumeyer, J. W. Daly, 8-Substituted Xanthines as Antagonists at A₁- and A₂-Adenosine Receptors, *Biochem. Pharmacol.*, **1988**, 37, 3653-3661.
- [86] K. A. Jacobson, K. L. Kirk, W. Padgett, J. W. Daly, Functionalized Congeners of 1,3-Dialkylxanthines: Preparation of Analogues with High Affinity for Adenosine Receptors, *J. Med. Chem.*, **1985**, 28, 1334.
- [87] F. Suzuki, J. Shimada, H. Mizumoto, A. Karasawa, K. Kubo, H. Nonaka, A. Ishii, T. Kawakita, Adenosine A₁ Antagonists. 2. Structure-Activity Relationships on Diuretic Activities and Protective Effects against Acute Renal Failure, *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 3066-3075.
- [88] M. H. Holschbach, D. Bier, W. Wutz, S. Willbold, R. A. Olsson, Synthesis of the Main Metabolite in Human Blood of the A₁ Adenosine Receptor Ligand [¹⁸F]CPFPX, *Org. Lett.*, **2009**, 11, 4266-4269.
- [89] J. Houben, T. Weyl, O. Bayer, H. Meerwein, K. Ziegler, *Methoden der organischen Chemie; Carbocyclische Dreiring-Verbindungen* IV/4; 4. Auflage, E. Müller (Eds.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1971**.
- [90] J. Houben, T. Weyl, O. Bayer, H. Meerwein, K. Ziegler, *Methoden der organischen Chemie; Isocyclische Vierring-Verbindungen* IV/4; 4. Auflage, E. Müller (Eds.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1971**.
- [91] J. Sanster, *Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry*, John Wiley & Sons, Chichester, **1997**.
- [92] V. W. Pike, PET radiotracers: crossing the blood-brain barrier and surviving metabolism, *Trends in Pharmacological Sciences*, **2009**, 30, 431-440.
- [93] C. Hansch, A. Leo, *Substituent constant for correlation analysis in chemistry and biology*, Wiley, New York, **1979**.
- [94] ChemAxon, *MarvinSketch*, <http://www.chemaxon.com/products/marvin/marvinsketch/>, 19.07.2014 14:05:18,
- [95] OrganicChemistryPortal, *Osiris*, <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>, 19.07.2014. 14:23:43,
- [96] *Molinspiration*, <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>, 19.07.2014 14:49:18,
- [97] H. Pajouhesh, G. R. Lenz, Medicinal Chemical Properties of Successful Central Nervous System Drugs, *NeuroRx*, **2005**, 2, 541-553.
- [98] M. Schelhaas, H. Waldmann, Schutzgruppenstrategien in der organischen Synthese, *Angew. Chem.*, **1996**, 108, 2192-2219.
- [99] F. Weygand, W. Steglich, J. Bjarnason, R. Skhtar, N. Chytil, Vergleichende Untersuchungen zur Abspaltung substit. Benzylreste vom Amidstickstoff und

-
- deren Kombinationsmöglichkeiten mit Urethanschutzgruppen, *Chem. Ber.*, **1968**, *101*, 3623-3641.
- [100] J. Barluenga, F. J. Fañanás, R. Sanz, C. Marcos, J. M. Ignaciob, 2-Arylallyl as a new protecting group for amines, amides and alcohols, *Chem. Commun.*, **2005**, 933-935.
- [101] M. W. Hu, P. Singh, E. F. Ullman, Use of (Pivaloyloxy)methyl as a Protecting Group in the Synthesis of Antigenic Theophylline (1,3-Dimethylxanthine) Derivatives, *J. Org. Chem.*, **1980**, *45*, 1711-1713.
- [102] P. G. M. Wuts, T. W. Greene, *Protective groups in organic synthesis - fourth edition*, John Wiley & Sons, Hoboken, **2006**.
- [103] M. Yamanaka, M. Arisawa, A. Nishida, M. Nakagawa, An intriguing effect of Yb(OTf)₃-TMSCl in the halogenation of 1,1-disubstituted alkenes by NXS: selective synthesis of allyl halides, *Tetrahedron Letters*, **2002**, *43*, 2403-2406.
- [104] S. Vincent, C. Mioskowski, L. Lebeau, Hydrolysis and Hydrogenolysis of Formamidines: N,N-Dimethyl and N,N-Dibenzyl Formamidines as Protective Groups for Primary Amines, *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 991-997.
- [105] S. Raucher, J. E. Macdonald, R. F. Lawrence, Indole Alkaloid Synthesis via Claisen Rearrangement. Total Synthesis of Secodine, *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 2419-2424.
- [106] H. Eckert, M. Listl, I. Ugi, The 2,2,2-Trichloro-*tert*-butyloxycarbonyl Group (TCBOC) - An Acid- and Base-Resistant Protecting Group Removable under Mild Conditions, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1978**, *17*, 361-362.
- [107] T. Kamimura, T. Masegi, T. Hata, Protection of Imide Group of Uracil Moiety by Means of 2,2,2-Trichloro-*tert*-butyloxycarbonyl Chloride: a Selective Synthesis of 2-O-Methyluridine, *Chem. Letters*, **1982**, *11*, 965-968.
- [108] A. Madin, C. J. O'Donnell, T. Oh, D. W. Old, L. E. Overman, M. J. Sharp, Total Synthesis of (±)-Gelsemine, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 2934-2936.
- [109] D. C. Gowda, Magnesium/hydrazinium monoformate: a new hydrogenation method for removal of some commonly used protecting groups in peptide synthesis, *Tetrahedron Letters*, **2002**, *43*, 311-313.
- [110] R. Puig-De-La-Bellacasa, L. Gimenez, S. Pettersson, R. Pascual, J. I. Borrell, J. Teixido, E. Gonzalo, J. A. Este, B. Clotet, Diverse combinatorial design, synthesis and in vitro evaluation of new HEPT analogues as potential non nucleoside HIV-1 reverse transcription inhibitors, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2012**, *54*, 159-174.
- [111] M. Mansurova, M. S. Koay, W. Gärtner, Synthesis and Electrochemical Properties of Structurally Modified Flavin Compound, *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, 5401-5406.
- [112] E. Edstrom, Y. Wei, A New Synthetic Route to β-2'-Deoxyribosyl-5-substituted Pyrrolo[2,3-d]pyrimidines. Synthesis of 2'-Deoxycadeguomycin, *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 5069-5076.

- [113] M. Sako, S. Ohara, K. Hirota, K. Kano, Y. Maki, Mechanistic Aspects of the Oxidation of 1,3-Disubstituted 6-Amino-5-nitrosouracils with Lead Tetraacetate: The Formation of Pyrimido[5,4-g]pteridinetetrone 10-Oxides, *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 6302-6306.
- [114] P. A. S. Smith, J. H. Hall, R. O. Kan, The Electronic Character of the Azido Group Attached to Benzene Rings, *J. Am. Chem. Soc.*, **1962**, *84*, 485-489.
- [115] H. B. Cottam, H. Shih, L. R. Tehrani, D. B. Wasson, D. A. Carson, Substituted Xanthines, Pteridinediones and Related Compounds as Potential Antiinflammatory Agents. Synthesis and Biological Evaluation of Inhibitors of Tumor Necrosis Factor α , *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 2-9.
- [116] D. C. Gowda, B. Mahesh, S. Gowda, Zinc-catalyzed ammonium formate reductions: Rapid and selective reduction of aliphatic and aromatic nitro compounds, *Indian Journal of Chemistry*, **2001**, *40B*, 75-77.
- [117] S. J. Cowling, J. W. Goodby, Interfacial layer interactions: their effects on synclinic and anticlinic smectic mesophase behaviour in liquid crystals, *Chem. Commun.*, **2006**, *39*, 4107-4109.
- [118] E. A. Hill, M. W. Hallade, Rearrangement of the Grignard reagent from 1-methylcyclobutylmethyl bromide: origins of the methyl substituent effect, *Journal of Organometallic Chemistry*, **1988**, *352*, 263-272.
- [119] J. A. Hoffmann, M. A. Tilak, The Successful Synthesis of Glycyl-Glycine Peptide Bonds via the Excess Mixes Anhydride Method, *Org. Prep. Proced. Int.*, **1975**, *7*, 215-219.
- [120] J. R. Dunetz, Y. Xiang, A. Baldwin, J. Ringling, General and Scalable Amide Bond Formation with Emomeritation-Prone Substrates Using T3P and Pyridine, *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 5048-5051.
- [121] S. Gowda, D. C. Gowda, Application of hydrazinium monoformate as new hydrogen donor with Raney nickel: a facile reduction of nitro and nitrile moieties, *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 2211-2213.
- [122] B. A. Alewi, M. Kurosu, A reliable Pd-mediated hydrogenolytic deprotection of BOM group of uridine ureido nitrogen, *Tetrahedron Letters*, **2012**, *53*, 3758-3762.
- [123] T. Shinozuka, H. Kobayashi, S. Suzuki, K. Tanaka, H. Kimoto, Y. Domon, Cycloalkane derivatives, Patent *US2014045862 (A1)*, **2014**.
- [124] J. A. Bender, M. Ding, R. G. Gentles, P. Hewawasam, Cyclopropyl Fuses Indolobenzazepine HCV NS5B Inhibitors, Patent *WO2009067108 (A1)*, **2009**.
- [125] R. R. Goodman, S. H. Snyder, Autoradiographic Localisation of Adenosine Receptors in Rat Brain using [^3H]Cyclohexyladenosine, *J. Neurosci.*, **1982**, *2*, 1230-1241.
- [126] J. Fastborn, A. Pazs, J. M. Palacios, The distribution of adenosine A₁ receptors and 5'-nucleosidase in the brain of some commonly used experimental animals, *Neuroscience*, **1987**, *22*, 813-826.

7 Anhang

Funktionelle Untersuchungen von Adenosinrezeptorliganden an Zellen verschiedener Zelllinien

NKH 477 als unspezifischer Ligand

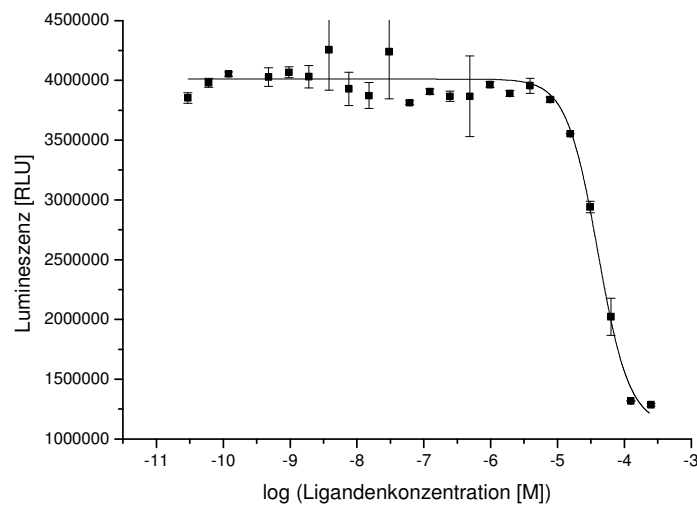


Abb. I: Lumineszenzsignale in Abhängigkeit von der NKH 477-Konzentration an Zellen der CHO WT-Zelllinie.

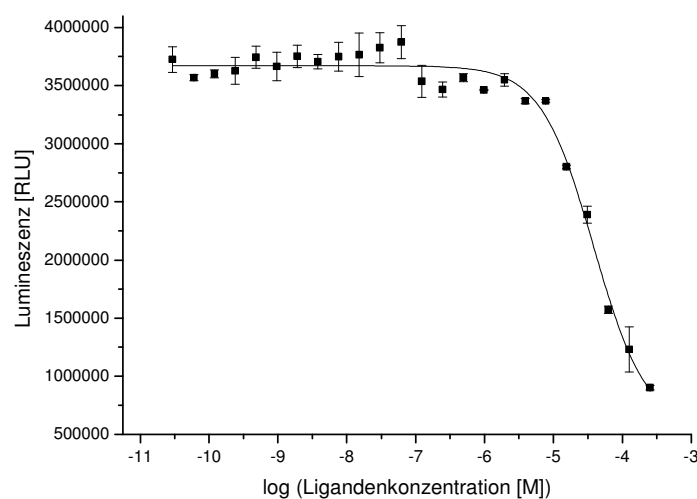


Abb. II: Lumineszenzsignale in Abhängigkeit von der NKH 477-Konzentration an Zellen der CHO T3#3-Zelllinie.

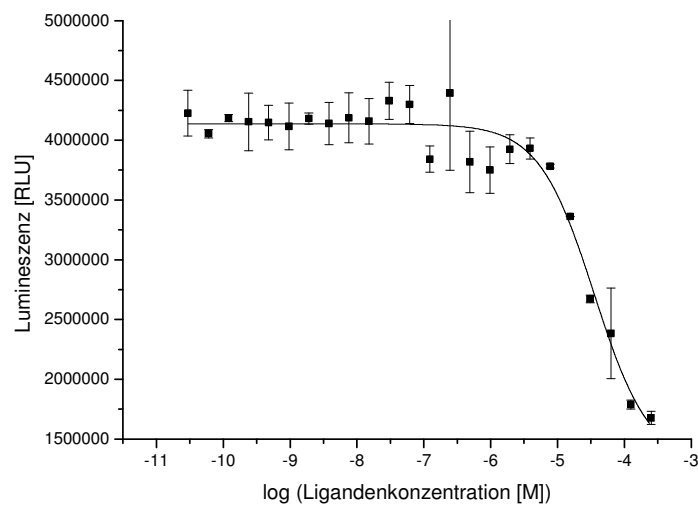


Abb. III: Lumineszenzsignale in Abhängigkeit von der NKH 477-Konzentration an Zellen der CHO#38b-Zelllinie.

NECA als Adenosin-spezifischer Ligand

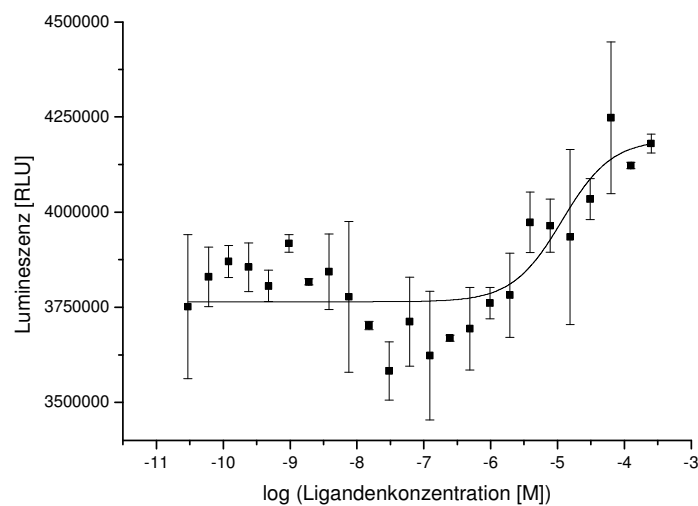


Abb. IV: Lumineszenzsignale in Abhängigkeit von der NECA-Konzentration an Zellen der CHO WT-Zelllinie.

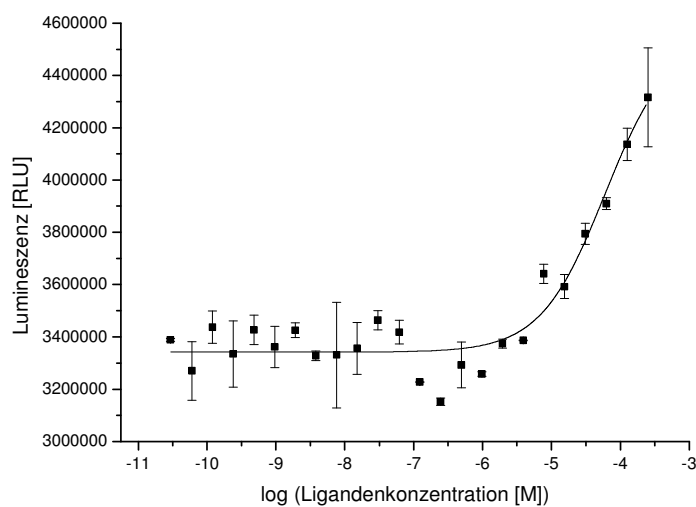


Abb. V: Lumineszenzsignale in Abhängigkeit von der NECA-Konzentration an Zellen der CHO T3#3-Zelllinie.

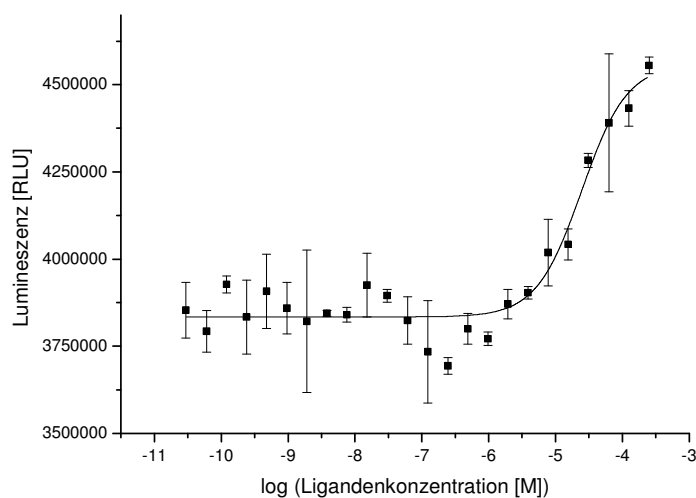


Abb. VI: Lumineszenzsignale in Abhängigkeit von der NECA-Konzentration an Zellen der CHO#38b-Zelllinie.

CGS 21860 als Adenosin A_{2A}-spezifischer Ligand

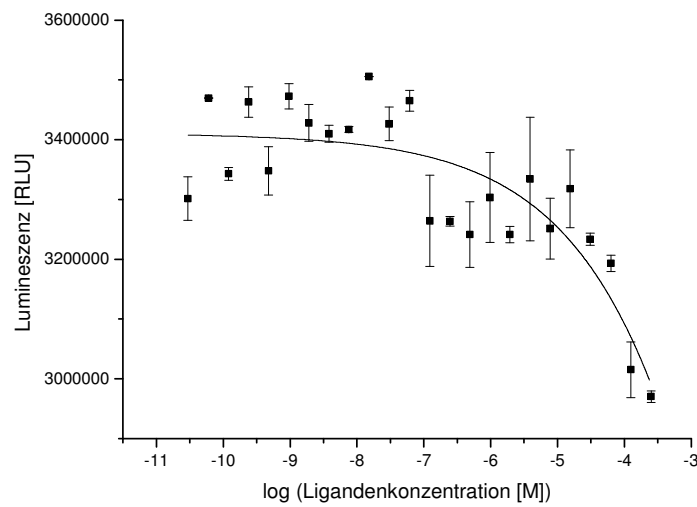


Abb. VII: Lumineszenzsignale in Abhängigkeit von der CGS-Konzentration an Zellen der CHO WT-Zelllinie.

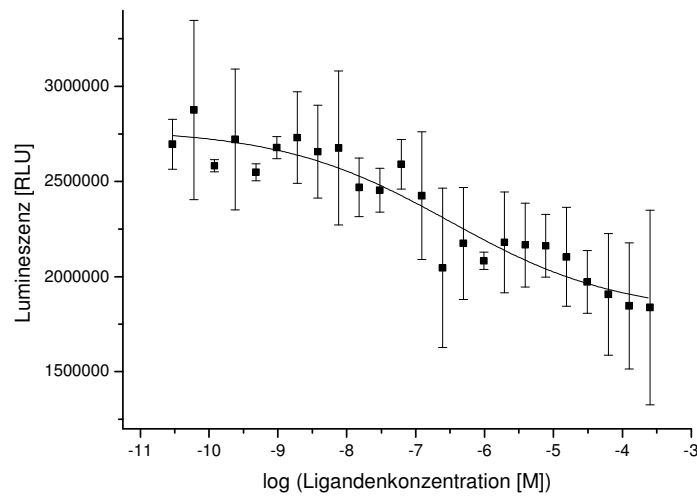


Abb. VIII: Lumineszenzsignale in Abhängigkeit von der CGS-Konzentration an Zellen der CHO T3#3-Zelllinie.

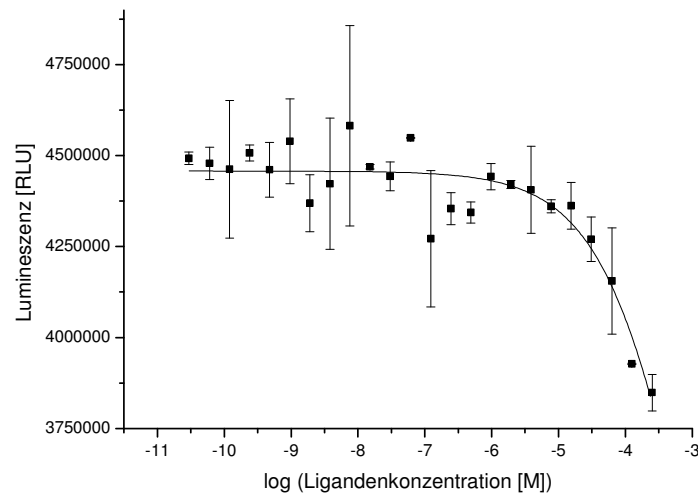


Abb. IX: Lumineszenzsignale in Abhängigkeit von der CGS-Konzentration an Zellen der CHO#38b-Zelllinie.

CPA als Adenosin A₁-spezifischer Ligand

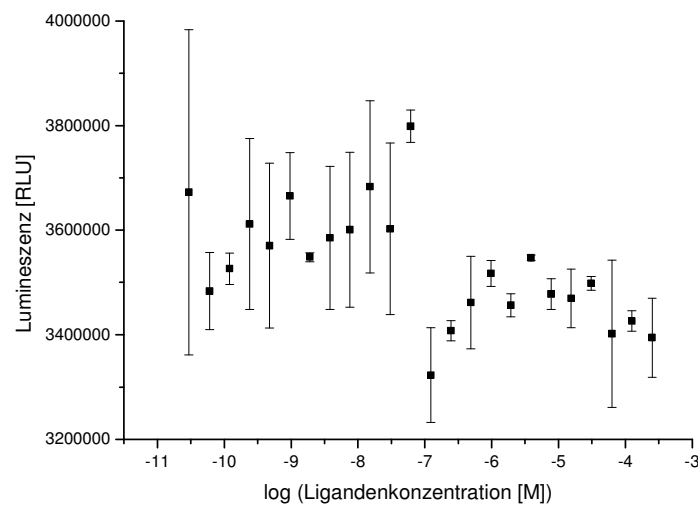


Abb. X: Lumineszenzsignale in Abhängigkeit von der CPA-Konzentration an Zellen der CHO WT-Zelllinie.

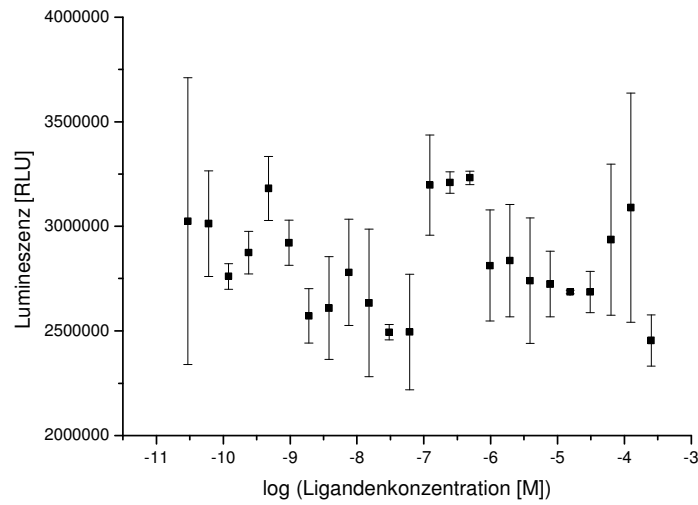


Abb. XI: Lumineszenzsignale in Abhängigkeit von der CPA-Konzentration an Zellen der CHO T3#3-Zelllinie.

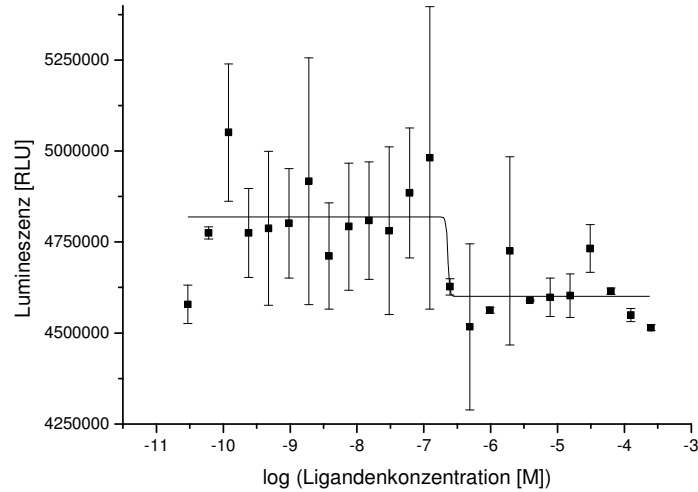


Abb. XII: Lumineszenzsignale in Abhängigkeit von der CPA-Konzentration an Zellen der CHO#38b-Zelllinie

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Heinz H. Coenen herzlich für die interessante und vielseitige Themenstellung, die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit, die stetige Unterstützung sowie der Möglichkeit bedanken, diese Arbeit unter den guten Arbeitsbedingungen in seinem Institut anfertigen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dirk Bier und Herrn Dr. Marcus Holschbach für die hervorragende persönliche Betreuung meiner Arbeit sowie die stete Hilfsbereitschaft, wertvollen Anregungen und Ratschlägen bei den Problemen des Laboralltags.

Ein weiterer Dank geht an Frau Anette Schulze und Frau Melanie Hübner für die freundliche Hilfe bei der Einarbeitung in die Zellkulturtechniken sowie der Bindungsstudien. Frau Anette Schulze danke ich weiterhin für die Durchführung der autoradiographischen Untersuchungen meiner Substanzen.

Ebenso geht mein Dank an Herrn Frank Mergner, Herrn Stefan Spellerberg und Herrn Anton Fixmann für ihre Bemühungen zur Einhaltung der erforderlichen Strahlenschutzmaßnahmen sowie an Herrn Karl-Heinz Riedel für die Hilfe in mechanisch-technischen Angelegenheiten.

Den Zyklotronoperatoren Manfred Holzgreve und Klaus Adrian danke ich für die regelmäßige Produktion und Bereitstellung des für meine Arbeit benötigten Fluor-18.

Bei allen Mitarbeitern möchte ich mich herzlich für die freundliche Aufnahme im Institut und die Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Ein großer Dank geht an meine Eltern Petra und Bernd Kreft, meine Geschwister Tobias und Julia Kreft, meinen Freund Fabian Sadowski und all meine Freunden, die mich während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit in jeglicher Art unterstützt und moralisch begleitet haben.

